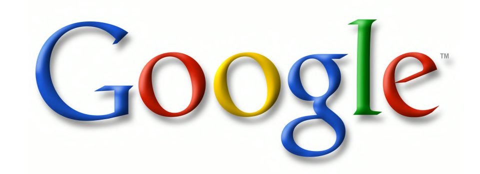
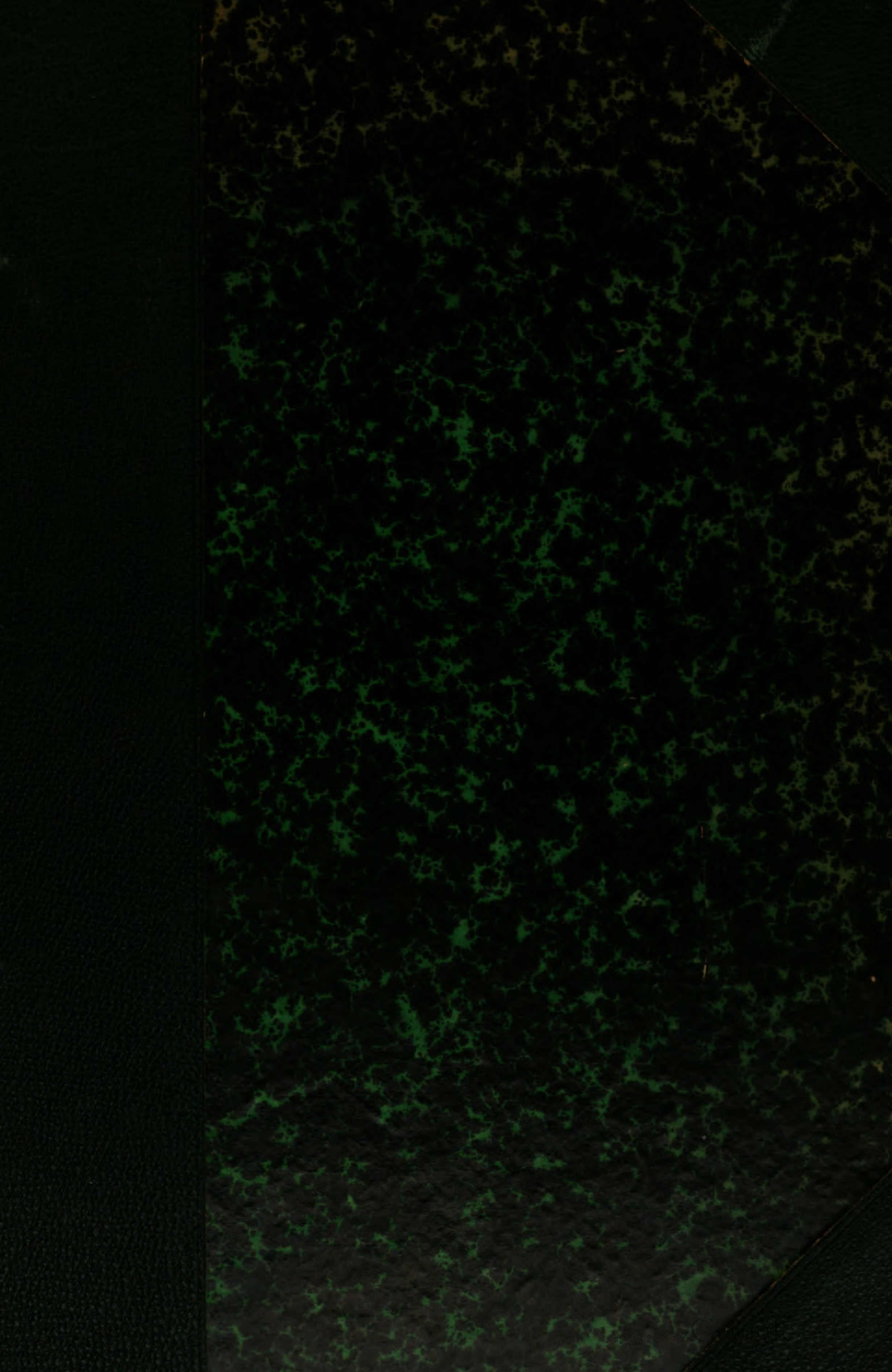







SIGILLVM ACADEMIAE HARVARDIANAE IN NOV ANG
CHRISTO ET ECCLESIAE
VE RI TAS

Handbuch

der

Embryologischen Technik

von

Dr. med. **Paul Röthig**
früher Assistent am anat.-biol. Institut Berlin

Mit 34 Abbildungen im Text

WIESBADEN
VERLAG VON J. F. BERGMANN
1904

Druck von Carl Ritter in Wiesbaden.

Herrn Geh. Rat Prof. Dr. OSKAR HERTWIG

Inhalt

Vorwort

Der Plan zu dem „Handbuch der embryologischen Technik“ entstand im Jahre 1901. In meiner Eigenschaft als Assistent an der embryologischen Abteilung des anatomisch-biologischen Instituts zu Berlin waren zu wiederholten Malen aus den Reihen der Praktikanten und Studierenden Anfragen nach einem Buche über embryologische Technik an mich gerichtet worden. Da sich dies mit einer gewissen Regelmäſsigkeit von Semester zu Semester wiederholte, sah ich, dass tatsächlich ein Bedürfnis nach einem derartigen Werke vorlag und ich beschloss daher, mich der Abfassung eines solchen zu widmen.

Das „Handbuch der embryologischen Technik“ setzt die Grundzüge mikroskopischer Forschungsmethoden voraus. Es wendet sich an die, welche speziell embryologisch arbeiten, und will eine möglichst vollständige und eingehende Darstellung aller bisher veröffentlichten embryologischen Untersuchungsmethoden geben, aber dies nicht lediglich auf Grund ausgiebiger literarischer Studien, sondern ganz besonders auf Grund zahlreicher eigener Untersuchungen. Es sind in ihm alle Erfahrungen enthalten, die ich in meiner mehr als 5jährigen Assistententätigkeit habe machen können. Ich habe mich bemüht, alle publizierten Methoden nachzuprüfen, soweit dies bei der Schwierigkeit, das geeignete entwickelungsgeschichtliche

Material zu erhalten, nur irgend möglich war. War somit von vornherein die Abfassungszeit des Buches eine lange, so wurde seine Fertigstellung noch verzögert durch verschiedene widrige äussere Umstände; durch schwere Krankheit in meiner Familie, durch das Siechtum und schliessliche Ableben meines geliebten Vaters wurde ich in meinen Arbeiten vielfach schwer gehindert und musste oft ganze Gebiete, die fast fertig gestellt waren, wieder von neuem zu bearbeiten anfangen. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Abfassung länger als zwei Jahre in Anspruch nahm.

Als ich an die Bearbeitung des Werkes heranging, lagen ausser den kurzen Darstellungen in dem „Taschenbuch der mikroskopischen Technik von Böhm und Oppel“ und den Angaben im Werke von Éternod nur die embryologischen Ausführungen in dem Buche von Lee und Mayer „Grundzüge der mikroskopischen Technik“ vor, die aber auch nur mehr oder weniger anhangsweise behandelt waren. Dazu kamen dann noch die in dem Häcker'schen Werke „Praxis und Theorie der Zellen- und Befruchtungslehre“ eingestreuten embryologischen Angaben. Inzwischen ist nun einmal das Buch von H. E. Ziegler „Lehrbuch der vergleichenden Entwickelungsgeschichte der niederen Wirbeltiere“ erschienen, das eine Reihe embryologischer Methoden, aber auch nur anhangsweise, beschreibt sowie das gross angelegte Werk von Ehrlich, Krause, Mosse, Rosin, Weigert: „die Encyklopädie der mikroskopischen Technik“. In diesem hat Ballowitz der embryologischen Technik einen besonderen Abschnitt gewidmet, und auch sonst sind an verschiedenen Stellen zahlreiche embryologisch-technische Angaben enthalten. Gleichwohl aber glaube ich, dass auch das vorliegende Handbuch nicht überflüssig ist, spiegelt es doch nicht nur meine persönlichen Erfahrungen wieder, sondern behandelt es doch auch Abschnitte, die in der Encyklopädie und in manchem anderen der erwähnten Werke keine

Berücksichtigung gefunden haben. So habe ich meine Aufmerksamkeit auch der Beschaffung des embryologischen Untersuchungsmateriales, der Angabe geeigneter Bezugsquellen und all den Fragen gewidmet, die sich mit der Pflege und Aufzucht der Larven beschäftigen.

Was die Einrichtung des Buches betrifft, so habe ich in dem ersten Kapitel eine kurze Zusammenstellung der wichtigsten histologischen Fixierungs- und Färbungsmethoden gegeben; es schliessen sich daran die folgenden an, welche die embryologischen Methoden bei den verschiedenen Tieren berücksichtigen. In Kapitel 12 hat auch die Technik in der histogenetischen Entwickelung, sowie in der Entstehung der Zähne, des Blutes und des Zentralnervensystems eine Darstellung gefunden. Genau berücksichtigt worden ist ferner das Gebiet der bekannten Einbettungs- und Rekonstruktions-Verfahren, sowie der experimentellen Entwickelungsgeschichte. Was letztere betrifft, so habe ich mich verhältnismäfsig kurz fassen können, da dasselbe vor nicht langer Zeit zwei ausführliche Darlegungen erfahren hat, einmal in dem entsprechenden Abschnitt der Encyklopädie und dann in dem Buche von Maass „Einführung in die experimentelle Entwickelungsgeschichte“. Kurz sind ferner auch erwähnt die Methoden, welche für die Untersuchung der Entstehung des Myelins und Glykogens in Betracht kommen, sowie das sinnreiche Verfahren von Hochstetter zur Darstellung des embryonalen Gangsystems.

Meine literarischen Quellen waren, abgesehen von den oben genannten grösseren Werken, die Originalarbeiten und die Referate in der „Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie“.

Wenn ich jetzt das Buch der Öffentlichkeit übergebe, so geschieht es mit dem Wunsche, dass es seinerseits dazu beitragen

möge, die Lust und Liebe zur embryologischen Forschung zu steigern und mit der Bitte um Nachsicht für die etwaigen Fehler und Mängel, die sich bei solchem Werke kaum ganz vermeiden lassen. Dank sage ich all denen, die mich bei der Abfassung des Buches freundlichst unterstützt haben, so meinem Schwiegervater, Herrn Königl. Rat J. Jochens, der mir bei den literarischen Studien vielfach behülflich gewesen ist, sowie dem Herrn Verleger für die in den letzten zwei Jahren bewiesene Geduld und das liebenswürdige Entgegenkommen bei der Drucklegung des Werkes.

Charlottenburg-Berlin W. 62 im Dezember 1903.
Courbière-Str. 8

Dr. Paul Röthig.

Kapitel I

Übersicht über einige Fixierungs- und Färbungsmethoden

Carnoysche Flüssigkeit. (La cellule t III 1887.)

1. Alkohol abs. 3
   Eisessig 1
2. Alkohol abs. 6
   Chloroform 3
   Eisessig 1

Chrom-Essigsäure. [1])

1. Chromessigsäure nach Flemming
   Chromsäure . . . . 2—2,5
   Essigsäure 1
   Wasser 1000
2. Chromessigsäure nach Ehlers
   Chromsäure . . . . 1/2—1 g
   Wasser 100
   Eisessig . . . . 1—5 Tr.
3. Chromessigsäure nach Lo Bianco
   1. 50 proz. Essigsäure 1
      1 proz. Chromsäure 20
   2. 50 proz. Essigsäure 2
      1 proz. Chromsäure 20
   3. 50 proz. Essigsäure + 1/10 einer 1 proz. Chromsäure.

---

1) Vergl. Lee u. Mayer, p. 34—36.

Chrom-Osmium-Essigsäure (Flemming).[1])

I.	Chromsäure	$2^1/_2$ g
	Osmiumsäure	1 „
	Eisessig	1 „
	Wasser	1000 „

= schwaches Flemmingsches Gemisch. „Um sich das Gemisch aus den vorrätigen Lösungen zu bereiten", nehme man

nach Lee und Mayer

1 proz. Chromsäure	25
1 proz. Osmiumsäure	10
1 proz. Essigsäure	10
Wasser	55

nach Fol (Folsches Gemisch)

1 proz. Chromsäure	25
1 proz. Osmiumsäure	2
2 proz. Essigsäure	5
Wasser	68

nach Westinghausen

1 proz. Osmiumsäure	1—1,5
1 proz. Chromsäure	25
2 proz. Essigsäure	5
Wasser	70

II.	1 proz. Chromsäure	15
	2 proz. Osmiumsäure	4
	Eisessig	1

= starkes Flemmingsches Gemisch;

nach Podwyssozki (Podwyssozki'sche Flüssigkeit). (Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 3 p. 405)

$^1/_2$ proz. wässr. Sublimatlösung, in der krystallinische Chromsäure zu 1 Proz. gelöst ist	15 ccm
2 proz. Osmiumsäure	4 „
Eisessig	6—8 Tropfen.

Formol (Formalin).

Ziegler (Lehrbuch 1902) empfiehlt ganz allgemein für Eier und Embryonen eine 4 proz. Lösung für 8 Tage anzuwenden, dann

[1]) Vergl. Lee u. Mayer, p. 34—36.

die Objekte für je 1 Tag in 30 proz. und 70 proz. Alkohol zu bringen und in 95 proz. Alkohol aufzuheben.

Formol-Pikrin-Essigsäure (Bouin). (Anat. Anzeig. Bd. 20 1901).

Pikrinsäure conc. wässrig 75
Formol 20
Eisessig 5

Sie ist nach Regaud frisch zu bereiten.

Hayemsche Flüssigkeit. (Zeitschr. wiss. mikrosk. Bd. 6, 1889).

Sublimat 1
NaCl 2
Natriumsulfat 10
Aq. dest. 400

Kaliumbichromat-Eisessig (Tellyesniczky). (Arch. mikr. Anat. Bd. 52 1898).

Kaliumbichromat . . . . 3 g
Aq. dest. . . . . 100 ccm
Eisessig . . . . 5 „

Langsche Flüssigkeit. (Vogt und Yung, Lehrb. vergl. Anat. 1888 Bd. 1 Seite 19; Zool. Anz. Jahrg. 2 1879).

1. Sublimat . . . . 3—12 gr
   Chlornatrium . . . . 6—10 „
   Eisessig . . . . 5—8 ccm
   Aq. dest. . . . . 100 „
   Alaun . . . . 0,5 gr
2. Pikrin-Schwefelsäure, mit Sublimat ges. 100
   Eisessig 5

Carnoy hat die Langsche Flüssigkeit folgendermafsen modifiziert (vergl. Biol. cellul. 1884, Seite 95):

Aq. dest. 100
Essigsäure 5
(oder für letztere
Chlornatrium . . . . 3)
Sublimat 5

Hermannsche Flüssigkeit. (Arch. mikr. Anat. Bd. 34, 1889).

1. 1 proz. Platinchlorid 15
   Eisessig 1
   2 proz. Osmiumsäure 4
   (für Säugetiere).

2. 1 proz. Platinchlorid . . . . . , . 15
Eisessig 1
2 proz. Osmiumsäure 2
(für Amphibien).

Hermannsche Lösung nach Bouin. (Bibl. anat. T. 6, 1898.)

Die Osmiumsäure der Hermannschen Originalvorschrift ist durch Formol ersetzt.

Iridiumchlorid-Essigsäure nach Eisen. (Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 14, 1897.)

1. $^1/_2$ proz. Platinchlorid 50
$^1/_2$ proz. Iridiumchlorid 50
Eisessig 1

besser noch, besonders für eine gleichmäfsige Fixation in den verschiedenen Teilen des Objektes (Hoden von Diemyctylus):

2. $^1/_2$ proz. Iridiumchlorid 100
Eisessig 1
3. $^1/_5$ proz. Iridiumchlorid 100
Eisessig 1

Niessingsche Gemische. (Arch. mikr. Anat. Bd. 46.)

1. 10 proz. Platinchlorid 25
2 proz. Osmiumsäure 20
Eisessig 5
Aq. dest. 50
2. 10 proz. Platinchlorid 25
2 proz. Osmiumsäure 20
Eisessig 5
konz. wässr. Sublimat 50

Gemisch von Nikiforoff.

Alkohol abs. -Äther aa.

Osmiumsäure: Haltbarmachen der Osmiumsäure:[1])

1. Man fertigt eine 2 proz. Lösung in 1 proz. Chromsäure an und benutzt diese statt der einfachen 2 proz. wässr. Lösung (Lee).
2. Man setzt zu der 2 proz. wässr. Lösung so viel Kaliumpermanganat, dass sie hellrosa wird. Bei Entfärbung Zu-

[1]) Vergl. Lee u. Mayer, 1901, p. 26.

satz von neuem Kaliumpermanganat. (Cori, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 6, 1890.)

3. Man setzt zu 100 ccm der Osmiumsäurelösung 10 Tropfen einer 5proz. Sublimatlösung (P. Mayer).

Osmium-Essigsäure nach Hertwig:

Osmiumsäure $^1/_5$, Essigsäure 2. Die Osmiumsäure und die Essigsäure sind in 1000 Teilen Seewasser gelöst. (Vergl. Fol, Vergl. mikroskop. Anat. 1896, Seite 109.)

Perényische Flüssigkeit. (Zool. Anzeig. V, 1882.)

10proz. Salpetersäure	4
Alkohol	3
$^1/_2$proz. Chromsäure	3

Pikrin-Essigsäure (Boveri). (Jen. Zeitschr. f. Naturw. Bd. 21, 1887.)

Pikrinsäure (konz. Lösung)	100
Aq. dest.	200
Eisessig	3

Pikrin-Essig-Sublimat.

Sublimat konz.	1000
Pikrinsäure konz.	1000
Eisessig	50
Wasser	2000

Pikrin-Essig-Sublimat (vom Rath). (Anat. Anzeig. Bd. XI, 1895.)

Konz. wässr. Pikrinsäure	100
In Kochsalzlösung gesättigtes Sublimat	100
Eisessig	2

Pikrin-Salpetersäure (Paul Mayer). (Mitt. Zool. Stat. Neapel Bd. 2, 1880.)

Salpetersäure von 25 Prozent N_2O_5 . .	5
Aq. dest.	100

Hierin Pikrinsäure bis zur Sättigung.

Pikrin-Schwefelsäure (Kleinenberg). (Vergl. Lee und Mayer Seite 56.)

Pikrinsäure konz. wässr.	100
Schwefelsäure	2

Filtration; Verdünnung des Filtrates mit dem dreifachen Volumen Wasser. Zusatz von Kreosot soviel als sich löst, oder von 2 % Chlornatrium.

Pikrin-Schwefelsäure (Paul Mayer, Lee u. Mayer Seite 56).

Aq. dest. 100
Schwefelsäure 2

Hier hinein Pikrinsäure bis zur Sättigung; dann Verdünnung mit dem dreifachen Volumen Wasser.

Pikrin-Schwefelsäure (Fol). (Vergl. Lee u. Mayer Seite 56.)

Herstellung der Mischung nach Kleinenberg; zu dem verd. Filtrat setzt man den dritten Teil des Volumens an 1 proz. Chromsäure.

Pikrin-Schwefelsäure (Kleinenberg).

Hergestellt nach den Angaben von Wistinghausen. (Mitt. Zool. Stat. Neapel Bd. 10, 1891.)

Pikrinsäure konz. wässr. 100
Aq. dest. 300
Schwefelsäure 2

Alkoholische Pikrin-Schwefelsäure (Mc. Murrich, Journ. of Morph. vol. 11, 1895.)

Lösung von Pikrinsäure in 70 proz. Alkohol bis zur Sättigung. Hinzufügen von je 2 Vol. Schwefelsäure auf 100 Vol. dieser Lösung.

Pikrin-Osmium-Essigsäure (vom Rath). (Anat. Anz. Bd. 11, 1896.)

1. Pikrinsäure konz. wässr. . . . 1000

Nun Filtration; dazu dann

kryst. Osmiumsäure . . . . 1 gr

und nach einigen Stunden

Eisessig . . . . 4 ccm

2. Pikrinsäure konz. wässr. filtriert . . 200
2 proz. Osmiumsäure 12
Eisessig 2

Fixationsdauer $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde, 24—48 Stunden je nach der Grösse des Objektes. Dann gleich in 75 proz. Alkohol u. s. f.

Merkels Gemisch. (Lee u. Mayer Seite 49.)

Platinchlorid	1
Chromsäure	1
Wasser	800

Merkels Gemisch nach Eisig-Whitmann. (Lee u. Mayer, S. 50.)
$^1/_4$ proz. Platinchlorid, 1 proz. Chromsäure aa.

Platinchlorid-Formol-Pikrin-Ameisensäure nach Bouin. (Bibl. anat. T. 6, 1898.)

1 proz. Platinchlorid	20
Pikrinsäure konz. wässr.	20
Formol	10
Ameisensäure	5

Platinchlorid-Pikrin-Essigsäure (vom Rath).

Pikrinsäure konz. wässr.	200
Platinchlorid (in 10 ccm Wasser gelöst)	1 gr
Eisessig	2 „

Fixationsdauer bis zu 24 Stunden, dann 75 proz. Alkohol etc.

Platinchlorid-Pikrin-Osmium-Essigsäure (vom Rath).

1.	Pikrinsäure konz. wässr.	200
	2 proz. Osmiumsäure	25
	Platinchlorid (in 10 ccm Wasser gelöst)	1 gr
	Eisessig	2 „
	(Starke Lösung.)	
2.	Pikrinsäure konz. wässr.	200
	2 proz. Osmiumsäure	12
	Platinchlorid (in 10 ccm Wasser gelöst)	1 gr
	Eisessig	2 „
	(Schwache Lösung.)	

Fixationsdauer $^1/_4$ Stunde (kleine Objekte), mehrere Tage (grosse Objekte). Weiterbehandlung auf zwei Weisen:

1. direkt in steigenden Alkohol;
2. in Methylalkohol zum kurzen Abspülen, unreinen Holzessig 12—24 Stunden, Methylalkohol zum kurzen Abspülen, steigender Alkohol. In 95 proz. solange bis keine Farbe mehr abgegeben wird. Statt Holzessig auch 20 proz. Tanninlösung (Rawitz).

Salpetersäure (Altmann)[1].

Salpetersäure (spez. Gewicht 1,02) . .	3—3,5
Aq. dest.	100

Sublimat.

Sublimat „löst sich in 15 Teilen kalten und in weniger als 3 Teilen kochenden Wassers" (Lee u. Mayer, Seite 43); Heidenhain (Festschrift für Kölliker, Leipzig 1892) löst Sublimat heiss in 0,5—0,6 proz. Kochsalzlösung bis zur Sättigung. Beide Lösungen werden in verschiedener Weise mit Eisessig versetzt. Darüber geben die speziellen Vorschriften bei den einzelnen Objekten Aufschluss.

Sublimat (Apáthy). (Mikrotechnik Bd. 1, Seite 111.)

Sublimat	3—4 gr
Kochsalz	0,5 gr
50 proz. Alkohol	100

Sublimat (Mingazzini). (Vergl. Lee u. Mayer Seite 46.)

Sublimat konz. wässr.	2
Eisessig	1
abs. Alkohol	1

Sublimat (Carnoy). (Vergl. Carnoy, Biol. cellul. 1884, S. 94.)

Aq. dest.	200—500 ccm
Sublimat	1 gr

Sublimat (Gilson). (Vergl. Carnoy, Biol. cellul. 1884, S. 95.)

60 proz. Alkohol	60
Aq. dest.	30
Glycerin	30
Essigsäure (15 Eisessig : 85 Aq. dest.) .	2
Sublimat	0,15 gr

Salpetersäure-Sublimat-Eisessig (Gilson).

1. Salpetersäure (46°)	3
Essigsäure 15 : 85 Aq. dest. . . .	3
Sublimat in Aq. dest. ges.	31
Alkohol (60°)	10
Aq. dest.	53

(La cellule T. 1.)

[1]) Lee u. Mayer p. 37.

2. Salpetersäure (46°) 15
Eisessig 4
Sublimat . . . . 20 gr
Alkohol (60°) 100
Aq. dest. 880

(zit. n. Lee u. Mayer, Seite 47.)

Sublimat-Essigsäure (Drüner). (Jen. Zeitschr. Naturw. Bd. 28.)

Konz. Sublimat 15
Aq. dest. 300
Eisessig 15

Sublimat-Osmium-Essigsäure (Drüner).

Konz. Sublimat 15
Aq. dest. 300
Eisessig 15

Auf 20 Teile dieses Gemisches kommt 1 Teil 1proz. Osmiumsäure.

Sublimat-Alkohol-Essigsäure[1]) (vom Rath). (Anat. Anz. Bd. 11, 1896.)

Alkohol abs. 200
Eisessig 2
Sublimat . . . . 1 gr

Sublimat-Pikrinsäure (Rabl). (Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 11, 1894.)

Sublimat konz. wässr. 1
Pikrinsäure konz. wässr. 1
Aq. dest. 2

Platinchlorid-Sublimat (Rabl).

1 proz. Platinchlorid 1
Sublimat konz. 1
Aq. dest. 2

Man erhöht den Wasser- und Platinchloridgehalt, wenn sich Schrumpfung einstellen sollte.

Sublimat-Platinchlorid-Eisessig (v. Lenhossék.) (Arch. mikr. Anat. Bd. 51.)

Konz. wässr. Sublimat 50
1 proz. Platinchlorid 50
Eisessig 5

[1]) Über Sublimat-Alkohol-Eisessig (v. Lenhossék) siehe Seite 191 Anm.

Pikrin-Sublimat-Osmium-Essigsäure (vom Rath).

Pikrinsäure konz. wässr.	100
Sublimat, in Kochsalzlösung ges. . . .	100
2 proz. Osmiumsäure	20
Eisessig	2

Weiterbehandlung

1. direkt steigender Alkohol;
2. Holzessig oder Tannin (siehe Platinchlorid-Pikrin-Osmium-Essigsäure).

Zenkersche Flüssigkeit. (Münch. med. Wochenschr. 1894, No. 27; Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 11; Bibl. anat. T. 2, 1894.)

Aq. dest.	100
Sublimat	5
Kali bichromic.	2,5
Natrium sulfuric.	1

Eisessig wird zu diesem Gemisch kurz vor dem Gebrauch hinzugefügt und zwar entweder 1 Eisessig auf 20 Gemisch oder 10 Eisessig auf 100 Gemisch.

Flüssigkeit von Cholodkowsky. (Mém. Acad. St. Petersburg Sér. 7 T. 38, 1891.)

Jod	1
Jodkalium	2
Wasser	300

Flüssigkeit von Ripart und Petit.

Kampherwasser, nicht gesättigt . . .	75
Aq. dest.	75
Eisessig	1
Essigsaures Kupfer	0,3
Kupferchlorid	0,3

Jodserum nach Frey. (Vogt u. Yung, Vergl. Anat. Bd. 1 1888, Seite 19.)

Wasser	135
Eiweis	15
Kochsalz	0,2

Filtration; nach derselben Einträufeln von 3 Teilen Jodtinktur; auf den Boden kommen einige Krystalle Jod.

Einige Färbungsmethoden

Beale's Carmin. (Cit. nach Fol. Vergl. mikr. Anat. 1896, S. 190.)

Er besteht aus Carmin 0,6 gr, Ammoniakflüssigkeit 2 gr, Glycerin 60, Aq. dest. 60, Alkohol 15 gr.

(Cit. nach Behrens, Tabellen, Seite 107.)

Carmin 1, Ammoniak 1,5 ccm, Glycerin 80 ccm, Alkohol 120 ccm, Wasser 25 ccm. Carmin und Ammoniak werden zusammen einige Sekunden gekocht, eine Stunde lang offen stehen gelassen und dann fügt man die übrigen Reagentien hinzu und filtriert.

Carminlösung nach Gerlach = carminsaures Ammoniak.

Gierke zerreibt die grossen viereckigen Stücke von Carmin möglichst fein und giebt dazu soviel Wasser und Ammoniak, bis der Farbstoff ganz gelöst ist. Diese Lösung bleibt in offener Schale eine Zeit lang an der Luft stehen. Dann Filtration. Diese so gewonnene Flüssigkeit soll dann noch lange, 2 Jahre, in gut verkorkter Flasche stehen, ehe sie gebraucht wird. Zum Gebrauch giebt man von dieser (konz.) Stammlösung einige Tropfen in Aq. dest. bis dasselbe hellrosa gefärbt ist und färbt 24—48 Stunden. (Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 1, Seite 76.)

Alaun-Carmin (Grenacher). (Arch. mikr. Anat. Bd. 16, 1879.)

Bei der Herstellung der Farblösung ist es am besten mit sehr konz. Alaunlösung oder einer solchen von Ammoniakalaun zu arbeiten. Man kocht eine 1—5 proz. Lösung eines dieser Stoffe mit $^1/_2$—1 % gepulverten Carmins ca. 10—20 Minuten anhaltend und filtriert nach dem Erkalten.

Cochenille-Alaun (Czokor). (Rabl, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 11.)

Man vermischt 25 gr pulverisierter Cochenille mit ungefähr ebensoviel Alaun, giesst dazu 800 gr Aq. dest.; in einer Abdampfschale kocht man das Ganze unter beständigem Umrühren, bis es auf 600 gr eingeengt ist. Nach dem Erkalten Filtrieren. Dazu ein Stückchen Thymol.

Eisenalaun-Cochenille (Spuler). (Encyclopädie Bd. 1, Seite 153.)

Man kocht 40 gr Cochenille in Aq. dest. und filtriert nach dem Erkalten; den Filterrückstand kocht man nochmals mit dest.

Wasser und filtriert wieder nach dem Erkalten. Beide Filtrate werden zusammengegossen und auf 200 ccm eingedampft. Dazu kommt 96 proz. Alkohol bis eine Fällung eintritt; man dekantiert und filtriert und dampft das Filtrat auf 400 ccm ein. Zur Stückfärbung wird diese Lösung auf das doppelte Volumen verdünnt. Die Objekte bleiben darin 48 Stunden im Brutschrank; dann Abspülen in Aq. dest. und Bringen in $^3/_4$ proz. Eisenalaunlösung für 24 Stunden; diese wird dann allmälig auf eine 1 proz. verstärkt. Nach einigen Tagen Waschen, Alkohol, Einbettung.

Bergonzini'sches Gemisch. (Anat. Anz. Bd. 6, 1891.)

$^2/_{10}$ proz. Lösung von Säurefuchsin . . .	1
„ „ „ Methylgrün . . .	2
„ „ „ Goldorange . . .	2
(oder Orange G)	

Färbungszeit 3—4 Minuten; Wasser 1—2 Minuten; abs. Alkohol 2 Minuten; Kreosot (Bergamottöl, Terpentinöl) Balsam.

Borax-Carmin (Grenacher). (Arch. mikr. Anat. Bd. 16, 1879.)

1. Man kocht 1—2 Prozent Borax in Wasser mit $^1/_2$—$^3/_4$ Prozent Carmin und setzt der Lösung vorsichtig unter stetem Umrühren solange tropfenweise verdünnte Essigsäure zu, bis die Färbung immer mehr ins Hochrote sich verändert. Dann lässt man 24 Stunden stehen und dekantiert oder filtriert vom Niederschlag ab.
2. Man versetzt von 60—80 proz. Alkohol 50 ccm mit 3—4 Tropfen Salzsäure und kocht in dieser Quantität (50 ccm) des HCl-Alkohols ungefähr eine Messerspitze gepulverten Carmins 10 Minuten lang.
3. Cit. nach Fol: Vergl. mikr. Anat. 1896, Seite 185: „In 100 ccm Wasser löst man 4 gr Borax und — in der Wärme — noch 2—3 gr Carmin; die Lösung wird mit 100 ccm Alkohol verdünnt und filtriert."
4. Man verreibt in einer Reibschale mit einander 20 gr Borax und 15 gr gepulverten Carmin. Dann mischt man 500 gr Wasser mit 500 gr 70 proz. Alkohol, schüttet das Gemenge von Borax und Carmin in diese Mischung hinein und lässt tüchtig aufkochen (Methode des anat. biol. Institutes).

Borax-Carmin-Bleu de Lyon.

Boraxcarminvorfärbung verbunden mit Bleu de Lyon-Nachfärbung siehe Seite 206 (Tonkoff) und Seite 214 (Knochenentwicklung).

Borax-Carmin-Bleu de Lyon nach Drüner. (Jen. Zeitschr. Naturw. Bd. 28.)

1.	Boraxcarmin	10
	1 proz. Lösung von Bleu de Lyon in Aq. dest.	1
2.	Boraxcarmin	30
	1 proz. Lösung von Bleu de Lyon in Aq. dest.	1

1. dient zur Durchfärbung (24 Stunden; Hoden von Salamandra, fixiert mit Sublimat-Essigsäure nach Drüner).
2. zur Schnittfärbung.

Essigsäure-Carmin (Essigcarmin nach Schneider). (Cit. nach Fol: Vergl. mikr. Anat. 1896, Seite 184.)

„Eisessig wird zu 45 % mit Wasser vermengt und bis zum Kochen erwärmt. In dieser siedenden Flüssigkeit wird gepulverter Carmin zugesetzt, bis er sich unter Umrühren nicht mehr auflöst. Die erkaltete und abfiltrierte Flüssigkeit kann entweder direkt auf lebende Gewebe oder mit Wasser bis zu 1 % verdünnt zur Verwendung kommen. Die erhaltene Farbe ist rötlich violett und beschränkt sich nach kurzer Zeit auf die Kerne. Leider sind die Präparate nicht haltbar; die Methode ist nur zur augenblicklichen Untersuchung oder zu Demonstrationszwecken geeignet. Will man jedoch ein Präparat einige Tage aufheben, so sauge man die essigsaure Flüssigkeit ab und ersetze dieselbe durch gesättigte Kaliacetatlösung“.

Pikro-Lithioncarmin (Orth). (Berl. Klin. Wochenschr. Jahrg. 20 1883, No. 28.)

Man löst in einer gesättigten Lösung von Lithion carbonicum $2^1/_2$ Prozent Carmin und vermischt dieses Lithioncarmin mit konz. wässriger Pikrinsäurelösung unter Schütteln im Verhältnis von 1 : 2—3. Die Objekte werden nachher mit HCl-Alkohol (1 HCl : 100 70proz. Alkohol) behandelt, wobei man acht zu geben hat, dass die Pikrinsäurefärbung nicht verschwindet.

Pikrocarmin (Poljakoff). (Arch. mikr. Anat. Bd. 45 1895, Seite 575/76.)

Dieses Pikrocarmin stellt man sich her, „indem man Ranvier's Anweisungen folgt, indem jedoch die Lösung nicht bis zum trocknen Reste eindampft, sondern sich darauf beschränkt, sie bis zu einem Drittel ihres Volumens einzudampfen; wenn hierbei der Überschuss an Ammoniak nicht entfernt ist, setzt man Aq. dest. bis zum anfänglichen Volumen zu und wiederholt die Operation bis man eine neutrale Lösung erhält. Diese Lösung muss nun wieder mit Wasser bis zu der gehörigen Konzentration (bis zur Farbe einer Kirschessenz) versetzt und eine halbe Stunde lang gekocht werden. Hierauf wird die Lösung heiss filtriert und 24 Stunden lang abgekühlt. Aus der so erhaltenen Pikrocarminlösung wird während dieser Zeit der Überschuss an Pikrinsäure in Gestalt von pikrinsaurem Ammoniak ausgefällt, welches minimale Quantitäten von Carmin mitreisst. Nun ist die Pikrocarminlösung zum Gebrauch fertig". Dieser Farblösung kann mit Vorteil auch noch 0,5 proz. Osmiumsäure zugesetzt werden im Verhältnis von Pikrocarmin 2 — Osmiumsäurelösung 1.

Pikrocarmin (Weigert). (Arch. path. Anat. Bd. 84 1881, S. 283.)

Man nimmt 2 gr Carmin, übergiesst diese mit 4 gr Ammoniak und lässt sie 24 Stunden vor Verdunstung geschützt stehen und fügt dann noch 200 gr einer konz. Pikrinsäurelösung hinzu. Dann lässt man wieder 24 Stunden stehen. „Um nun aus diesem noch nicht sicher und schnell kernfärbenden Carmin ein brauchbares zu machen, ist es nur nötig, geringe Mengen Essigsäure zuzusetzen, bis der erste ganz schwache Niederschlag auch nach dem Umrühren erfolgt. Lässt man dann die Lösung 24 Stunden stehen, so tritt gewöhnlich ein etwas stärkerer Niederschlag auf, welcher sich auch durch Filtrieren nicht ganz aufheben lässt". . . . Man kann die Masse dadurch klar bekommen, „dass man jetzt tropfenweise von neuem Ammoniak zusetzt und dann immer die Lösung 24 Stunden stehen lässt, bis dann endlich nach immer wieder erneutem Zusatz dieser ganz kleinen Mengen von Ammoniak die Lösung im Laufe eines Tages ganz klar geworden ist. . . . . Färbt

die so erhaltene Lösung zu gelb, so setzt man etwas Essigsäure hinzu, überfärbt sie sehr schnell in rotem Tone, so wird dies durch eine kleine Menge Ammoniak beseitigt."

Alizarinfärbung nach Rawitz. (Vergl. die Arbeit von B. Rawitz in Anat. Anz. Bd. 11, 1895.)

Thionin-Rutheniumrot (Eisen.) (Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 14, 1897.) Die Objekte sind mit der Iridiumchlorid-Eisessigmischung (Eisen) fixiert. Man löst das Rutheniumrot in geringer Quantität in: Aq. dest. 80, Alkohol abs. 10, Glycerin 10. Diese Lösung verdirbt leicht; man stellt sie also erst kurz vor dem Gebrauch her. Eine verdorbene Lösung ist gelbbraun, eine brauchbare rot gefärbt. Die Schnitte werden vor der Färbungsflüssigkeit mit Aq. dest. abgespült und kommen dann für 5 Minuten in: Thionin 1, Wasser 90, Alkohol 10. Darauf Aq. dest., dem man einige Tropfen der erwähnten Rutheniumrotlösung zusetzt. Hierdurch wird die Thioninfärbung differenziert; dieser Prozess ist unter dem Mikroskop zu kontrollieren. Dann Alkohol, Xylol. Wenn man die angegebene Thioninlösung verdünnt, so färbt man die Schnitte 12—24 Stunden. Man kann mit dieser Methode eine Vorfärbung mit einer wässrigen Lösung von Kongorot verbinden.

Färbeflüssigkeit nach Ehrlich-Biondi. (Nach Reinbach; cit. nach Encyclopädie Bd. 1, Seite 75.)

Mit einer absolut trockenen Pipette entnimmt man den nachstehenden wässrigen Lösungen, die konzentriert sein müssen, die folgenden Mengen zur Herstellung des Gemisches:

Ges. wässr. Lösung (Orange G) . . .	120
„ „ „ (Säurefuchsin) . .	80
„ „ „ (Methylgrün) . .	100
Aq. dest.	300
Alkohol abs.	180
Glycerin	50

Ehrlich-Biondi nach Drüner. (Jen. Zeitschr. Naturw. Bd. 29.) Die Schnitte kommen in 1. die unverdünnte Ehrlich-Biondi'sche Lösung für 10 Minuten; 2. Abspülen in Brunnenwasser zwei Sekunden; 3. Abspülen in salzsaurem (1 ‰ HCl) abs. Alkohol eine Minute; 4. Alkohol etc. Balsam.

Ehrlich-Biondi nach R. Krause. (Arch. mikr. Anat. Bd. 42.)
Man stellt sich von Rubin S, Orange G, Methylgrün, die aus der Berl. Aktiengesellsch. f. Anilinfabrikation bezogen werden, konz. Lösungen her, wobei grössere Farbstoffmengen den Boden bedecken müssen. Es lösen sich in 100 ccm Aq. dest.:

	Rubin S	20,0
I	Orange G	8,0
	Methylgrün	8,0

Man mischt von diesen Stammlösungen (I), vorsichtig abgiessend,

	Rubin S	4 ccm
II mit	Orange G	7 ccm
und giebt dazu	Methylgrün	8 ccm

Zur Färbung nimmt man von Stammlösung II auf 50—100 ccm H_2O 1 ccm. Es ist gut, wenn diese Färbeflüssigkeit eine Spur Essigsäure enthält. Zu diesem Zwecke füllt man den Mafszylinder, in dem die Verdünnung der Stammlösung (II) vorgenommen werden soll, vorher mit 100 ccm H_2O + 5 Tropfen Eisessig, giesst dann aus und verdünnt. Der Essigsäuregehalt des Wassers, das die Wände des Mafszylinders benetzt, genügt zum Ansäuern. Färbungszeit 24 Stunden. Abspülen in 90 proz. Alkohol; dann abs. Alkohol, der ganz leicht angesäuert ist (1—2 Tropfen Eisessig auf 50 ccm abs. Alkohol). Manchmal ist es von Vorteil, statt der Essigsäure zum Ansäuern Ameisensäure zu nehmen.

Triacid (Ehrlich). (Cit. nach Encyclopädie Seite 88.)
Man mischt mit demselben Mafszylinder mit einander:

Konz. wässr. Orange G	13—14
Konz. wässr. Säurefuchsin	6—7
Aq. dest.	15
Alkohol abs.	15
Konz. wässr. Methylgrün	12
Alkohol	10
Glycerin	10

Gentianaviolett nach Ehrlich.

Gentianaviolett	1
Alkohol	15
Anilin	3
Wasser	80

Gentianaviolett nach Bizzozero.

Die Schnitte kommen in 1. Gentianaviolett (Ehrlich) 20 Minuten; 2. 95 proz. Alkohol bis sie hellblau werden; 3. Jodjodkaliumlösung bis sie schwarz sind; 4. 95 proz. Alkohol kurze Zeit; die Schnitte dürfen nicht vollständig entfärbt sein; 5) dünne Chromsäurelösung kurze Zeit (eine 1 proz. wässr. Lösung von Chromsäure wird soweit verdünnt, dass die Lösung strohgelb aussieht); 6. Alkohol, Xylol, Balsam.

Färbung nach Van Gieson. (Möller, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 15.)

1. Färbung in Hämatoxylin (Delafield) eine halbe Stunde.
2. Auswaschen in Aq. dest. 12—24 Stunden.
3. Färbung in einer van Gieson'schen Mischung, „zusammengesetzt aus 150 ccm in Wärme gesättigter Wasserlösung von Pikrinsäure und 3 ccm gesättigter Wasserlösung von Grübler's Säurefuchsin eine halbe bis eine Minute“.
4. „Abspülen in einer geringeren Menge destillierten Wassers, versetzt mit einigen Tropfen von der van Gieson'schen Mischung, bis es eine weinrote Farbe angenommen hat, eine viertel bis höchstens eine halbe Minute.“
5. 90 bis 96 proz. Alkohol, „versetzt mit der eben genannten Mischung, bis er eine hellrote Farbe angenommen hat, 2—5 Minuten“.
6. Abs. Alkohol 1 Minute.
   Origanumöl-Balsam.

Ich selber färbe mit dem Hämatoxylin (Böhmer) eine halbe Stunde und lasse die Schnitte darauf 24^h in Leitungswasser stehen. Dann behandele ich sie mit der van Gieson'schen Flüssigkeit in der Weise wie Möller.

Golgi-Ramon y Cajal'sche Methode.

Die Stücke kommen in

1 proz. Osmiumsäure	1
3 proz. Kal. bichromic.	4

auf 3 Tage; dann in 0,75 proz. Argent. nitric.-Lösung auf 1—2 Tage.

Hämatoxylin (Böhmer).

Man stellt sich 2 Lösungen her:

I besteht aus:	Hämatoxylin, krystall. . . .	0,35 gr
	Alkohol abs.	10 ccm

II besteht aus: Kalialaun . . . . 0,1 gr
Wasser . . . . 30,0 ccm

Nun wird die Lösung II tropfenweise mit I versetzt. Die neue Flüssigkeit bleibt 3—4 Tage am Licht stehen, um zu reifen. Dann Filtration. (Cit. n. Behrens, Tabellen 1898, p. 112.)

Hämatoxylin nach Hansen. (Zool. Anz. Bd. 18, 1895.)

I. 1 gr kryst. Hämatoxylin wird gelöst in 10 gr abs. Alkohol.

II. 20 gr Kalialaun werden unter Erwärmen in 200 gr Aq. dest. gelöst. Nach dem Erkalten Filtration. Nach 24 Stunden giesst man I. und II. zusammen. Nun bringt man genau 3 ccm einer bei 15° C. gesättigten Kaliumpermanganatlösung in eine Porzellanschale und giebt die Alaun-Hämatoxylinlösung (I. und II.) hinzu. Die resultierende Mischung wird zum Sieden erwärmt; nach 1 Minute schnelles Abkühlen der Schale durch Aufsetzen auf kaltes Wasser.

Hämatoxylin (Delafield). (Cit. nach Lee und Mayer S. 172.)
Man löst I. 4 gr Hämatoxylin in 25 ccm abs. Alkohol. II. Ammoniakalaun in Wasser bis zur Sättigung. Man mischt 400 ccm von II mit I und lässt die Mischung in einer offenen Flasche 3—4 Tage stehen. Dann Filtration. Darauf fügt man hinzu 100 ccm Glycerin und 100 ccm Methylalkohol. Filtration. Dann bleibt das Gemisch noch mindestens 2 Monate offen stehen.

Hämatoxylin (Delafield) nach Carnoy und Lebrun. (La cellule T. 12, 1897.)

Man sättigt heiss 100 ccm Aq. dest. mit Ammoniakalaun und fügt 1 gr Hämatoxylin, in etwas abs. Alkohol gelöst, hinzu. Das Ganze wird 3—4 Tage dem Licht ausgesetzt. Dazu kommen dann 25 ccm Glycerin und 25 ccm Methylalkohol. Nun filtriert man und lässt das Filtrat so lange am Licht stehen, bis es zur Hälfte eingedunstet ist.

Hämatoxylin (Ehrlich). (Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 3, S. 150.)

Hämatoxylin . . . . 2 gr
Alkohol abs. . . . . 100 ccm
Eisessig . . . . 10 ccm
Glycerin . . . . 100 „
Aq. dest. . . . . 100 „
Alaun . . . . im Überschuss.

Diese Mischung bleibt in offener Flasche so lange stehen, bis sie dunkelrot wird.

Hämatoxylin (Weigert).

Hämatoxylin	1
Alkohol abs.	10 ccm
Aq. dest.	90—100 ccm

Alkoholische Hämatoxylinlösung (Kleinenberg). (Cit. nach Fol. Vergl. Mikr. Anat. 1896, Seite 183.)

„In einer konz. Solution von Chlorcalcium in 70 proz. Alkohol wird noch Alaun bis zur Sättigung gelöst. Die Flüssigkeit wird alsdann mit dem 6—8 fachen Volumen 70 proz. Alkohols verdünnt und mit einer gesättigten Lösung von Hämatoxylin in abs. Alkohol tropfenweise versetzt, bis die gewünschte Stärke erreicht ist. Die Lösung muss violett mit einem Stich ins Blau erscheinen; nimmt sie eine rötliche Farbe an, so lässt man durch Aufsetzen eines mit Ammoniak benetzten Stöpsels Spuren von Ammoniak hinzutreten und schüttelt sie, bis die ursprüngliche Farbe wieder hergestellt ist. Vor dem Einlegen müssen die Objekte durch häufigen Alkoholwechsel völlig von der Säure befreit werden. Die Lösung soll schwach sein. Ist sie zu dunkel, so verdünnt man sie mit dem oben angegebenen Alkohol-Alaun-Chlorcalciumgemisch. Ist Überfärbung eingetreten, so extrahiert man die Farbe mit Alkohol, dem man $^1/_2$ proz. Oxal- oder Salzsäure zugesetzt hat und wäscht die Säure mit reinem Alkohol vollständig aus".

Alkoholisches Hämacalcium (Paul Mayer). (Cit. nach Lee und Mayer, Seite 173).

„Hämateïn (oder Hämateïn-Ammoniak) 1 g, Chloraluminium 1 g, Chlorcalcium 50 g, Eisessig 10 ccm (oder Essigsäure von 50 % 20 ccm), Alkohol von 70 % 600 ccm. Man reibt die beiden ersten Stoffe fein, löst sie in der Säure und dem Alkohol heiss oder kalt und setzt zuletzt das Chlorcalcium hinzu.

Das Gemisch ist rot violett; färbt es zu rot, so kann man dem durch Auswaschen mit einer 2 %igen Lösung von Chloraluminium in 70 %igem Alkohol oder mit einer $^1/_2$—1 %igen Lösung von Kaliumacetat in absolutem Alkohol abhelfen; gewöhnlich aber werden die Objekte schon durch das Waschen mit neutralem Alkohol violett oder blau.

Das Hämacalcium setzt nach einigen Monaten stark ab. Dem lässt sich einigermaſsen dadurch begegnen, dass man sich zwei Gemische macht, jedes mit der Hälfte des Alkohols und der Säure, und das eine mit allem Chlorcalcium, das andere mit allem Chloraluminium und Hämateïn; man nimmt dann beim Gebrauche aus jeder Flasche gleich viel."

Hämalaun nach Paul Mayer. (Cit. nach Lee und Mayer, S. 169.)

„Nach Mayer (Mitt. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891, p. 172) wird 1 g Hämateïn (oder Hämateïn-Ammoniak) durch Erwärmen in 50 ccm Alkohol von 90 % gelöst und zu einer Lösung von 50 g Alaun in 1000 ccm destilliertem Wasser gegossen. Nach dem Erkalten wird eventuell filtriert. (Man kann auch das Häm. statt in Alkohol durch Zerreiben im Mörser mit etwas Glycerin lösen.)

Das Hämalaun ist sofort zum Gebrauch bereit; es ist etwa von der Farbe des Boraxcarmins, wird aber allmälig mehr blauviolett, besonders in Flaschen von leicht zersetzbarem Glase, und bildet auch mit der Zeit an den Wänden der Flasche, auf dem Boden und an der Oberfläche Niederschläge; man schöpft daher am besten mit einer Pipette mitten aus der Flasche und wischt die Pipette, bevor man das Hämalaun aus ihr herausfliessen lässt, aussen gut ab. Es färbt Schnitte manchmal fast augenblicklich, jedenfalls aber in sehr kurzer Zeit, und eignet sich auch vorzüglich zum Durchfärben; dies kann allerdings 24—48 Stunden dauern, und das Auswaschen mitunter ebenso lange. In der Regel resultiert in den Schnitten eine reine Kernfärbung, und jedenfalls lässt sie sich durch Auswaschen mit Alaunwasser (1—2 %iger Lösung von Alaun) erzielen; dies gilt auch vom Durchfärben. Man muss aber unter allen Umständen den Alaun (des Hämalauns oder des Alaunwassers) gut wieder auswaschen, da er sich sonst im Balsam als Kristalle bemerkbar macht, und thut auch gut daran, nach dem destillierten Wasser noch Leitungswasser oder ein anderes Mittel zum Bläuen der Farbe anzuwenden. Auch zum Verdünnen des Hämalauns (bis auf $^1/_{20}$) nimmt man am besten Alaunwasser, nie aber Leitungswasser".

Eisen-Hämatoxylin (Heidenhain). (Arch. mikr. Anat. Bd. 43, 1894.)
Man beizt die Schnitte mehrere Stunden mit einer 1,5 proz. Lösung von Eisenalaun in Aq. dest. Diese Lösung muss auf kaltem Wege hergestellt werden, da das Salz sich in der Hitze zersetzt. Die Kristalle von Eisenoxydalaun „sollen hellviolett und durchsichtig aussehen". Nach der Beizung gründliches Abspülen in Aq. dest. Dann Färbung in einer 0,5 proz. wässr. Lösung von Hämatoxylin für 12—18 Stunden. Wiederum gründliches Abspülen in Wasser (Leitungswasser). Nun Differenzieren in der Beize. Die Differenzierung soll oft durch Abspülen der Schnitte in Leitungswasser unterbrochen und unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Danach langer Aufenthalt in Leitungswasser.

Eisen-Hämatoxylin (Benda). (Verh. anat. Ges. 7. Vers. Göttingen 1893.)
Beize: Liq. Ferri sulf. oxyd., verdünnt mit 2 Vol. Aq. dest. 24 Stunden, dann Aq. dest. und Leitungswasser.
Färbung: 1 proz. wässr. Lösung von Hämatoxylin bis die Schnitte schwarz sind.
Differenzierung: entweder mit 30 proz. Essigsäure oder mit verdünntem Liq. Ferri sulf. oxyd. (1 : 20 Aq. dest.).

Kupfer-Hämatoxylin (Benda). (Verh. physiol. Ges. Berlin 1885/86; Arch. Mikr. Anat. Bd. 30.)
Beizung 24 Stunden in einer starken Lösung von essigsaurem Kupferoxyd (konz. wässr. Lösung), dann Waschen in mehrmals erneuertem Wasser.
Färbung: 1 proz. Hämatoxylinlösung bis zur intensiven Schwärzung (ungefähr 5 Minuten).
Differenzierung: in verdünnter Salzsäure (1 : 300 bis 500), Neutralisierung der Säure, Wasser, Alkohol, Balsam.

Hämatoxylin (R. Heidenhain) verbunden mit Safranin nach Drüner (Jen. Zeitschr. Naturwiss. Bd. 29.)
1. Durchfärbung der Stücke mit 0,5 proz. wässr. Hämatoxylinlösung 36^h.
2. Darauf in $^1/_3$ proz. wässr. Lösung von einfach chromsaurem Kali 24^h.

Die Schnitte werden nachgefärbt mit alkohol. Safraninlösung 3 Tage. Sie werden differenziert mit salzsaurem ($1\,^0/_{00}$) abs. Alkohol.

Hämatoxylin (Plessen-Rabinovicz). (Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 8, 1891.)

Beizung: Erlicki'sche Flüssigkeit:

Kal. bichromic.	2,5 gr
Cupr. sulfur	0,5 „
Aq. dest.	100,0 „

für 1—2 Std. bei 50° C. Sodann Auswaschen. Darauf

Färbung in:

Hämatoxylin	1 gr
Alkohol abs.	5,0 gr
Aq. dest.	100,0 „
Eisessig	2,0 „

für 1—2 Std. bei 50° C. Dann Auswaschen.

Differenzierung in:

konz. wässr. Lösung von Lithion carbonic. . . .	50
1 proz. „ „ „ rotem Blutlaugensalz .	50

Hämatoxylin (Mallory). (Anat. Anz. Bd. 6, 1891.)

Hämatoxylin	1
Chloralhydrat	6—10
10 proz. Phosphormolybdänsäure . . .	1
Aq. dest.	100

Die Lösung bleibt eine Woche dem Lichte ausgesetzt.

Kernschwarz (Platner). (Vergl. Lee und Mayer, S. 225.)

Es ist ein nur in Lösung in dem Handel vorkommender Körper (zu haben bei Grübler und Hollborn). Man färbt für gewöhnlich nur wenige Minuten, bei Flemmingpräparaten aber 24 Std. Differenzierung in einer konz. oder verdünnten Lösung von Lithion carbonicum (Platner). Lee färbt erst mit Kernschwarz, spült in Wasser ab und färbt dann in gewöhnlicher Weise mit Safranin (oder Gentianaviolett, Victoriablau, Hämalaun). Hierbei ist Kernschwarz ein Plasmafarbstoff.

Kolossow'sches Reduktionsverfahren nach Osmiumsäure-Fixation. (Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 9.)

Man fixiert die Gewebe in 1—2 proz. wässr. Osmiumsäure oder in folgender Mischung, die kalt stehen muss: Alkohol abs. 50, Aq. dest. 50, Acid. nitric. konz. 2, Osmiumsäure 1—2 gr.

Nach der Fixation kommt das Objekt in die folgende Reduktionsflüssigkeit: Aq. dest. 450, 85 proz. Alkohol 100, Glycerin 50, Tannin. puriss. 30, Pyrogallussäure 30. Bei der Anfertigung dieser Mischung löst man zuerst 30 gr Tannin in 100 ccm Aq. dest.; diese Lösung bleibt 24—48 Stunden in unverschlossenem Gefäss stehen. Dann Filtration. Darauf löst man 30 gr Pyrogallussäure in 100 Aq. dest. und vermischt beide Lösungen; darauf fügt man 250 ccm Wasser, die erwähnte Menge Alkohol und Glycerin hinzu. Statt dieses Entwicklers kann man auch eine Glycerin-Tanninlösung (6—8 Teile 5 proz. Tanninlösung, 1 Teil Glycerin) nehmen. Danach kommt das Objekt noch einmal in eine $^1/_4$ proz. Osmiumsäurelösung zur stärkeren Färbung. Über die Kombination dieses Verfahrens mit einer Silberimprägnation vergl. die Originalarbeit.

Bindegewebsfärbung nach Mallory. (Ref. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 18, 1901.)

Färbung der Schnitte in

1. 0,05—0,1 proz. wässr. Lösung von Säurefuchsin 1—3 Minuten,
2. Auswaschen in Wasser,
3. 1 proz. wässr. Lösung von Phosphormolybdänsäure 1 Minute oder länger,
4. Auswaschen in 2 mal gewechseltem Wasser,
5. Färbung in

Anilinblau (wasserlöslich, Grübler) . .	0,5
Orange G (Grübler)	2,0
Oxalsäure	2,0
Wasser	100

Auswaschen in Wasser, Alkohol etc. Die Bindegewebsfasern treten dann besonders scharf hervor, wenn die Säurefuchsinfärbung fortgelassen wird.

Methylenblau (Nissl). (Vergl. Lee u. Mayer, Seite 357.) Färbung in:

Methylenblau	15
Venetian. Seife	7
Wasser	4000

unter Erwärmen auf 65—70° C.

Differenzierung in

wasserhelles Anilin	1
96 proz. Alkohol	9

Methylgrün-Säurefuchsin nach Auerbach und Bancroft siehe Seite 124 u. 131.

Pikro-Nigrosin.

1. nach Martinotti (Lee u. Mayer, p. 375) gesättigte Lösung von Nigrosin in gesättigter Lösung von Pikrinsäure. Färbungszeit 2—3 Std., dann Auswaschen in

Ameisensäure	1
Alkohol	2

2. nach Freeborn (Lee u. Mayer, p. 395)

1 proz. wässr. Lösung von Nigrosin	10
konz. wässr. Lösung von Pikrinsäure	90

Färbungszeit 3 Min. Dann Wasser etc. Balsam.

Orcein nach Unna-Tänzer. (Cit. nach Encyclopädie, Seite 193.) Man stellt zwei Lösungen her:

1.	Orcein (Grübler)	0,1
	Alkohol 95 proz.	20,0
	Aq. dest.	5,0
2.	Acid muriat.	0,1
	Alkohol 95 proz.	20,0
	Aq. dest.	5,0

Man mischt beide Lösungen zu gleichen Teilen und färbt mit dieser Mischung die Schnitte 24 Stunden. Ein anderes Verfahren besteht darin, dass eine 1 proz. Orceinlösung in 1 proz. Salzsäurealkohol hergestellt wird und die Schnitte hiermit 15—30 Minuten gefärbt werden. Darauf Entfärbung in Alkohol oder HCl-Alkohol.

Safranin (Pfitzner.) (Morph. Jahrb. Bd. 6.)

Safranin	1
Alkohol abs.	100
Aq. dest.	200

Färbungszeit einige Sekunden. Abspülen in Aq. dest., dann abs. Alkohol; hierin wird der überschüssige Farbstoff ausgezogen.

Safranin nach Zwaardemaker. (Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 4.)
„Man giebt in ein Uhrglas Anilinwasser und tröpfelt alkoholische Safraninlösung hinzu in nicht zu geringer, höchstens gleicher Quantität“. Färbung 2 Minuten bis 1 Stunde.

Safranin nach Babes. (Arch. mikr. Anat. Bd. 22; Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 4, Seite 470.)

1. konz. wässr. Lösung, konz. alkoholische Lösung āā.
2. eine in der Wärme konz. und in der Wärme filtrierte wässr. Lösung.
3. „zu 100 Teilen Wasser menge ich eine überschüssige Menge von Safraninpulver sowie 2 Teile von Anilinöl. Das Gemisch wird auf 60—80° erwärmt und durch ein feuchtes Filter filtriert.“

Safranin-Gentiana-Orange nach Flemming siehe Seite 193.

Safranin-Gentiana nach Hermann siehe Seite 192.

Safranin-Gentiana-Orange nach Reinke siehe Seite 193.

Safranin-Lichtgrün nach Benda. (Verh. Physiol. Ges. Berlin 1891/92.)
Anilin-Safraninlösung:

Safranin	1 gr
Alkohol	10 ccm
Anilinwasser	90 „

Färbungszeit 24^h.
Lichtgrün- oder Säureviolettlösung:
0,5 gr Lichtgrün- oder Säureviolett auf 200,0 gr Alkohol.
Färbungszeit $^1/_2$ Min.
Alkohol abs. Balsam.

Viktoriablau 4 B nach Lustgarten. (Vergl. Lee u. Mayer, S. 196.) Die wässrige Lösung färbt die Kerne gut, wenn die Schnitte vorher mit Jodtinktur behandelt sind. Die alkohol. Lösung, auf das 2—4fache mit Wasser verdünnt, färbt die elastischen Fasern, wenn die Objekte mit Chrom- oder Chromosmiumgemischen fixiert sind.

Weigert'sche Markscheidenfärbung.

Die von chromiertem Materiale stammenden Schnitte werden für 24 Stunden in mit der Hälfte Wasser verdünnter gesättigter

Lösung von essigsaurem Kupfer bei 37° gebeizt, falls nicht die ganzen Stücke in gleicher Weise dieser Behandlung unterworfen worden waren. Sie kommen dann in die Weigert'sche Hämatoxylinlösung für 24 Stunden und dann für die gleiche Zeit in Wasser, dem man auf 100 ccm 2 ccm einer gesättigten Lösung von Lithion carb. zugesetzt hat. Dann in folgende Differenzierungsflüssigkeit: Borax 2, Ferricyankalium 2 ½, Wasser 100, die Weigert für embryonale Objekte noch zu verdünnen empfiehlt.

Weigert-Pal'sche Markscheidenfärbung.

Färbeflüssigkeit:

Hämatoxylin	0,75
Alkohol	10,0
Wasser	90,0
Lithion carb. ges.	2

Danach (24 h) kommen die Schnitte in ¼ proz. Kaliumhypermang. 1 Minute. Dann in

Oxalsäure	1
Kal. sulfuros	1
Wasser	200

zur Differenzierung. Wasser, Alkohol.

Weigert'sche Färbeflüssigkeit für elastische Fasern. (Centralbl. allg. Path. Bd. 9, No. 8/9.)

Darstellung der Farblösung:

1 proz. Lösung von Fuchsin (Magentarot) }
2 proz. Lösung von Resorcin } I.

Beide Lösungen sind wässrige; von I werden 200 ccm in einer Porzellanschale gekocht. In die kochende Flüssigkeit kommen

Liq. ferri sesquichlorati Ph. G. III . . 25 ccm

Unter Umrühren kocht man 2—5 Min. lang; lässt dann erkalten und filtriert. Der Filter-Niederschlag wird in der vorher gebrauchten Schale — auf dem Wasserbade — mit 200 ccm 95 proz. Alkohol gekocht. Dann filtriert man und füllt das Filtrat mit 95 proz. Alkohol auf 200 ccm auf. Dazu kommen dann noch 4 ccm Salzsäure.

Kresofuchsin nach Röthig und Pranter.

1. nach Röthig (Arch. mikrosk. Anat. Bd. 56).

   Man fertigt sich die folgenden Lösungen an:

   I. die Stammlösung

Kresofuchsin	0,5 gr
Alkohol 95 %	100,0 „
Salzsäure	3,0 „

   II. die Färbeflüssigkeit

Stammlösung	40,0 ccm
Alkohol 95 %	24,0 „
Pikrinsäure 1:3 Aq. dest.	2,0 „

   Die Schnitte bleiben in der Färbeflüssigkeit 2^h oder beliebig länger. Selbst ein Aufenthalt bis zu 24^h schadet der Färbung nichts. Sie kommen dann in absoluten Alkohol und zwar nur solange, als nötig ist, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen und die Schnitte wasserfrei zu machen. Sie werden nach Überführung in Xylol in Kanadabalsam eingeschlossen.

2. nach Pranter, vergl. Centralbl. allg. Path. u. path. Anat. Bd. 13, 1902.

Kapitel 2

Einbettungsverfahren

Von den beiden in der Histologie gebräuchlichen Einbettungsarten, der Paraffin- und Celloidineinbettung kommt in der Embryologie fast ausschliesslich die Paraffineinbettung zur Anwendung, während der Gebrauch des Celloidins zur reinen Celloidineinbettung auf Ausnahmefälle beschränkt bleibt. Häufiger dagegen wird das Celloidin verwendet bei der sogenannten doppelten Einbettung, der kombinierten Celloidin-Paraffineinbettung. Statt des Celloidins wird oftmals das Kollodium gebraucht.

Da die Einbettungsweise in der Embryologie einen fast noch grösseren Einfluss auf die Erzielung guter Präparate hat als in der Histologie, stelle ich die Erfahrungen der histologischen und embryologischen Forscher kurz zusammen, indem ich mich dabei sowohl auf eigene Beobachtungen wie auf die Originalarbeiten stütze.

Allgemeiner Gang der Einbettung

Der allgemeine Gang bei der Paraffineinbettung ist folgender: Die Objekte sind entwässert und liegen in 95 proz. oder meistens in absolutem Alkohol; aus demselben kommen sie in eine Mischung von Alkohol und einem Lösungsmittel des Paraffins z. B. Chloroform, aus dieser in reines Chloroform. Dann der Reihe nach in eine Mischung von Chloroform und Paraffin (Schmelzpunkt 42°) ää, in Paraffin (42°), in

Paraffin (42°) . . . . . $^1/_3$
Paraffin (58°) . . . . . $^2/_3$

und schliesslich in reines Paraffin (58°). Die Zeitdauer, während welcher die Objekte in den einzelnen Medien liegen müssen, ist für die verschiedenen Fälle ganz verschieden. In einem besonderen Abschnitte dieses Kapitels sind diese Zeiten für eine Anzahl von Objekten zusammengestellt. Hier will ich nur hervorheben, dass es fast immer von Vorteil ist, den Aufenthalt in den verschiedenen Paraffinen so kurz wie möglich zu bemessen; Sache des Ausprobierens ist es, die unterste Zeitgrenze zu finden.

Ausser dem Chloroform werden als Durchgangsmedien vom Alkohol zum Paraffin noch eine ganze Reihe anderer Stoffe gebraucht. Zu diesen sogenannten Intermedien (Paul Mayer) gehören:

Intermedien

Terpentin, Bergamottöl, Cedernöl, Xylol, Toluol, Benzol, Benzin und Schwefelkohlenstoff. Die Überführung der Objekte aus dem Alkohol in das Intermedium kann unter Zuhilfenahme einer oder mehrerer Mischungen dieser beiden Mittel erfolgen oder dadurch, dass man nach Mayer und Giesbrecht den Alkohol über das Intermedium schichtet; dann sinkt das Objekt langsam aus dem Alkohol in das Intermedium hinunter.[1])

Chloroform

Chloroform. Meine Erfahrungen lassen sich dahin zusammenfassen: Es ist fast für alle Fälle brauchbar, für Eier und Keimscheiben sowohl wie für Embryonen verschiedenen Alters. Es dringt gut ein; die Objekte können selbst lange Zeit ohne Schaden in ihm

[1]) Vergl. zu dem Folgenden auch Lee und Mayer § 137/138.

liegen bleiben und schneiden sich nach ihrer Einbettung gut. Zwischen Alkohol und Chloroform und zwischen diesem und Paraffin schalte ich immer je mindestens eine Mischung ein und zwar 1. Alkohol absol.-Chloroform āā, 2. Chloroform-Paraffin (42°) āā; beide wirken nicht länger als 12 Stunden ein, wobei sich die Lösung 2 auf dem Paraffinofen befindet. Bei zarterem und schwerer zu durchtränkendem Material ersetze ich sie durch mehrere Alkohol-Chloroform- und Chloroform-Paraffin-Mischungen. Ehe die Objekte aus den letzteren in reines Paraffin kommen, werden sie auf $^1/_2$ bis 1 Stunde in der offenen Chloroform-Paraffin-Mischung in den Wärmeofen gesetzt. Dabei verdunstet Chloroform aus der Lösung und den Objekten und diese nehmen ganz allmählich die Temperatur des reinen Paraffins an. Carnoy und Lebrun bringen ihr Material direkt aus dem 95 proz. Alkohol in Chloroform-absol. Alkohol āā, Gathy in

95 proz. Alkohol	$^1/_4$
abs. Alkohol	$^1/_4$
Chloroform	$^1/_2$

erst dann kommt es in reines Chloroform.

Terpentin

Terpentin. Nach Lee und Mayer schadet Terpentin der feineren Struktur der Objekte, wenngleich es gut eindringt und sich leicht mit Paraffin mischt. Born und O. Schultze wandten es bei der Einbettung von Amphibieneiern, Graf Spee von Keimscheiben und Embryonen an.

Bergamottöl

Bergamottöl. Gebraucht unter anderem von Fick und O. Schultze bei Amphibieneiern, von Henking bei den Eiern der Phalangiden, von Mercier und Rabl bei den Embryonen verschiedener Wirbeltiere. Die Überführung in das Öl kann direkt aus dem 95 proz. Alkohol erfolgen (Fick und O. Schultze) oder aus dem absoluten Alkohol mit Einschiebung verschiedener Alkohol-Bergamottöl-Gemische (Rabl und Mercier); diese Lösungen sind die folgenden:

I.	Alkohol abs.	9,0	Öl	1,0
II.	„ „	7,0	„	3,0
III.	„ „	5,0	„	5,0
IV.	„ „	3,0	„	7,0
V.	„ „	1,0	„	9,0

Cedernöl

Cedernöl. Nach Lee ist es das beste Intermedium; man erhält mit ihm eine schnelle Aufhellung der Objekte sowie eine rasche und vollkommene Durchtränkung mit Paraffin. Das Material wird nie hart oder brüchig, selbst wenn es lange in dem Öl liegen bleibt. Apáthy kombiniert die Cedernöleinbettung mit der Durchtränkung durch Chloroform. Er hat dabei die Möglichkeit, die in Cedernöl stark aufgehellten Objekte vor der Einbettung zeichnen zu können, was aber auch der Fall wäre bei der Cedernöleinbettung allein. Sein Verfahren besteht in folgendem:

Die Objekte kommen aus dem absoluten Alkohol in

a) Cedernöl,
b) kaltgesättigte Lösung von Paraffin (55° C.) in Chloroform,
c) dieselbe Paraffin-Chloroformlösung wird 1—3 Stunden auf 60° erwärmt,
d) reines Paraffin (55° C.) auf mehrere Stunden.

Cedernöl und auch das vorhin erwähnte Bergamottöl haben nach Hoffmann einen unleugbar günstigen Einfluss auf das Verhalten dotterreicher Objekte beim Schneiden und bei der Färbung. Sie verhindern bei längerer Einwirkung das Brüchigwerden; ja ganz besonders Cedernöl erhöht mit der Zeit die Schneidbarkeit des Dotters; ausserdem setzen beide in keiner Weise, wie es der Alkohol bekanntlich tut, die Färbbarkeit der Objekte herab.

Xylol

Xylol. Es ist in der Embryologie sehr häufig angewandt worden; nach meinen Erfahrungen dringt es allerdings rasch ein und löst Paraffin gut, macht aber die Objekte sehr leicht hart und spröde.

Toluol Benzol Benzin

Toluol, Benzol, Benzin. Alle drei sind in der Embryologie bisher wenig angewendet worden. Toluol soll nach der Angabe von Holl besser als Chloroform sein. Nach Henking hat es, wie aus seinen Beobachtungen bei den Eiern der Phalangiden hervorging, folgenden Nachteil: Bei der Berührung mit geschmolzenem Paraffin verdunstet es sehr rasch, so dass sich bei den noch mit einer Schale umschlossenen Eiern das aus dem Eiinhalte gasförmig aufsteigende Toluol unter der Eischale fängt; daher schwimmt dann das Ei in Paraffin ohne unterzusinken. Eigene Erfahrungen stehen mir über dasselbe ebenso wenig wie über Benzol und Benzin zu Gebote. Benzol ist nach Brass und Paul Mayer ein gutes

Intermedium; gebraucht wurde es unter anderem auch von Kaiser, Rössler und Vosmaier und Pekelhäring; Benzin dagegen empfiehlt Retterer („La benzine Collas du commerce").

Schwefelkohlenstoff. Heidenhain hat im Jahre 1901 die Aufmerksamkeit auf den Schwefelkohlenstoff gelenkt, der seitdem von vielen Forschern als sehr brauchbares Intermedium gerühmt wird. Die Objekte liegen in absolutem Alkohol, kommen dann in a) Alkohol-Schwefelkohlenstoff āā, b) und c) reinen Schwefelkohlenstoff; in allen drei Flüssigkeiten bleiben sie je 24 Stunden. Zur weiteren Einbettung benutzt Heidenhain 2 Thermostaten, den einen mit einer Temperatur von 36—38° C., den anderen mit einer solchen von 56—57° C.; ferner 2 Standpulvergläser mit sehr gut eingeriebenem Glasstopfen. Beide sind bis $^1/_4$ oder $^1/_5$ mit Schwefelkohlenstoff gefüllt und kommen das eine auf den einen, das andere auf den anderen Thermostaten. Dann bringt man in sie so viel Paraffin (56°) hinein als sich lösen kann. In den so erhaltenen beiden Schwefelkohlenstoff-Paraffin-Mischungen verweilt das Material so lange bis es vollständig durchtränkt ist. Dann kommt es in reines Paraffin auf zweimal je 1—1$^1/_2$ Stunden, insofern als Heidenhain 2 Schalen mit reinem Paraffin verwendet. Nach meinen Versuchen ist diese Methode auch für embryologische Objekte, grössere Embryonen, Teile von Föten sehr gut brauchbar; die Nachteile liegen einmal in dem Geruch des Schwefelkohlenstoffs und dann in seiner hohen Feuergefährlichkeit. Pranter gebraucht neuerdings als Ersatz für den Schwefelkohlenstoff Ligroin oder Tetrachlorkohlenstoff, welch letzterer nicht giftig und nicht feuergefährlich ist. Die Objekte gelangen erst in Cedernöl bis sie vollkommen durchsichtig geworden sind, dann in Ligroin oder Tetrachlorkohlenstoff und in eine bei Zimmertemperatur gesättigte Lösung von Paraffin in einem der beiden Mittel. Nun wird das Material im Paraffinofen auf 58° C. erwärmt ($^1/_2$ Stunde) und in reines Paraffin (54—56°) übertragen, worin es auch schliesslich eingebettet wird.

Schwefelkohlenstoff

Ligroin Tetrachlorkohlenstoff

Orientierung der in Paraffin eingebetteten Objekte zur Erzielung einer bestimmten Schnittrichtung. Die richtige Orientierung des eingebetteten Materials ist in der Embryologie, wo man es mit ganz bestimmten Schnittrichtungen zu tun hat, ungemein wichtig. Wie schwer es aber ist, sie im Einzelfalle zu erreichen, sieht man schon aus der grossen Zahl der Methoden,

Orientierung



welche zu diesem Zwecke angegeben worden sind. Das leitende Prinzip bei ihnen allen ist, dem Objekt entweder im Einbettungsparaffin selbst oder vor demselben in einem anderen später ebenfalls mit Paraffin zu durchtränkenden Medium eine genau bekannte und leicht wieder zu erkennende Lage zu geben.

Die einfachste Methode, bei der aber schliesslich nur der Zufall die Orientierung herbeiführt, ist die von Lee, Erlanger und Rhumbler. Ich beschreibe sie nach den Mitteilungen des letztgenannten Forschers; sie ist von ihm für Infusorien, Amoeben und entkalkte Foraminiferen angegeben worden. Das Material liegt in Xylol oder einem anderen „Intermedium"; es kommt dann in Paraffin und zwar befindet sich das letztere in einem Uhrgläschen, dessen Boden vorher mit Nelkenöl eingerieben worden war. Hierin bleiben die Objekte so lange bis sie gehörig durchtränkt sind. Sie sinken zu Boden und liegen nach der Abkühlung des Uhrgläschens und Herausheben des Blockes an der Oberfläche des letzteren. In seinem zweiten Aufsatze empfiehlt Rhumbler zum Einreiben des Glases statt Nelkenöl Glyzerin; ferner gibt er an, dass es zweckmäfsig ist, die Objekte vor der Einbettung zu färben. Er geht dabei so vor, dass er dem Alkohol, den die Objekte vor dem Xylol sowieso passieren müssen, etwas Eosin zusetzt. Auf diese Weise können die leicht rot gefärbten Objekte unschwer erkannt werden.

nach Rhumbler

nach Kingsley

Ganz ähnlich ist das Verfahren von Kingsley. Die kleinen kuglichen Eier der Garneele liess er sich im Paraffin auf den Boden des Uhrglases senken. Nun wurde der Block herausgehoben, umgedreht und die Eier unter dem Mikroskop auf ihre Lage hin untersucht. Die, welche günstig lagen, schnitt Kingsley heraus, die andern bettete er nochmals auf die gleiche Art und Weise ein, bis auch sie richtig orientiert waren.

nach Samter

Um sehr kleine farblose und schwer färbbare Objekte im Paraffinblock leicht auffinden zu können, färbt Samter das sie durchtränkende Paraffin rot: er verreibt Alkannin in geschmolzenem Paraffin; das Alkannin löst sich und färbt das Paraffin rot. Nun kommt das Material aus Xylol oder Chloroform in eine Mischung von Alkannin-Paraffin und Xylol (Chloroform). Durch die Verdunstung des Xylols (Chloroforms) aus dieser Mischung wird es mit dem rot gefärbten Paraffin durchtränkt. Man bringt es dann in reines Paraffin und bettet in diesem ein. Auf den Schnitten löst

sich später das Alkannin zugleich mit dem Paraffin. Denselben Zweck erreicht man, wenn man nicht das Paraffin, sondern das Objekt selbst leicht mit Eosin oder mit Boraxkarmin vorfärbt.

Orientierung von Vogelkeimscheiben

Vogelkeimscheiben, die mit Boraxkarmin intensiv rot gefärbt sind, nachdem sie vom Dotter abpräpariert waren, bette ich in Papierkästchen ein, wobei die Längsachse derselben mit derjenigen des Kästchens zusammenfällt. In dem das Kästchen anfüllenden Paraffin sinken sie zu Boden, auf den sie sich flach hinlegen. Sie sind dann nach dem Abnehmen des Papiers nur von einer ganz dünnen Paraffinschicht bedeckt, durch die hindurch man alle Einzelheiten der Keimscheibe wahrnehmen und sich beim Schneiden nach ihnen richten kann. Es muss nur dafür gesorgt werden, dass bei und nach der Fixation die Keimscheiben ganz flach ausgebreitet bleiben; ferner muss das Paraffin im Kästchen heiss genug sein, um ein Erstarren der untersten Paraffinschichten vor dem Hinabsinken der Keimscheibe auf den Boden des Kästchens zu verhüten.

Ein anderer Gang der Orientierung ist der, dass man in besonderen Einbettungsgefässen entweder die Objekte durch plötzliche Abkühlung in der gewünschten Lage festhält oder während der Einbettung an dem Paraffinblock Marken anbringt, aus denen man später die Lagerung des Materials wieder zu erkennen vermag.

Orientierung nach Selenka

So hat Selenka folgenden Apparat konstruiert: Bei einer Glasröhre ist die eine Wand muldenförmig vertieft: in ihr nimmt man die Orientierung vor, während heisses Wasser die Röhre durchströmt und das Paraffin flüssig erhält. Hat das Objekt die gewünschte Lage, so leitet man schnell kaltes Wasser durch die Röhre, wodurch das Paraffin in der Mulde fast augenblicklich erstarrt und das Objekt in seiner Lage fixiert. Eine Abänderung dieses Apparates ist der von Andrews. Auf einer Flasche mit zwei ebenen Wänden, die auf den Tisch oder das Gestell einer Präparierlupe zu liegen kommt, ist durch Aufkitten von Glasstreifen ein Kästchen gebildet, dessen Boden eine der Wände der Flasche ist. Dieser Boden trägt eingeritzte Rinnen, nach denen die Orientierung vorgenommen wird. In die Flasche hinein ragen ein Zufluss- und ein Abflussrohr; das letztere endet in der Nähe des Flaschenhalses dicht an derjenigen (oberen) Flaschenwand, die das Kästchen trägt, das erstere dagegen am Boden der Flasche auf ihrer unteren Fläche. Durch Gabelung des Zuflussrohres wird es ermöglicht,

nach Andrews

dass während der Einbettung heisses, nach erfolgter Orientierung aber kaltes Wasser die Flasche durchströmt.

Orientierung für ältere Embryonen und Keimscheiben mit Dotter

Bei älteren Embryonen, die für quere, sagittale und frontale Schnittrichtung zu orientieren sind, und bei Keimscheiben, die noch auf dem Dotter liegen und bei denen wegen der Dicke des zu behandelnden Objektes und der damit verbundenen Undurchsichtigkeit die erwähnte Papierkästchen-Methode unbrauchbar ist, kommt man auf folgendem Wege leicht zum Ziele.

Eine rechteckig zugeschnittene Glasplatte trägt eingeritzt eine tiefe Rinne. Vor dem Auflegen der Neapeler Rähmchen werden diese und die Platte mit Glyzerin oder nach Born-Peter mit Alkohol abs.-Glyzerin āā bestrichen. Im Paraffin orientiert man so, dass das Objekt mit irgend einem Durchmesser auf der Rinne liegt. Nach dem Abkühlen hebt sich der Paraffinblock leicht von der Platte und den Rahmen ab und die Rinne auf seiner Unterseite gibt die Lage des Objektes an[1]).

Orientierung von Froscheiern

Wenn es bei der Orientierung z. B. bei derjenigen von Froscheiern nötig ist, das Paraffin längere Zeit flüssig zu erhalten, so kann man sich mit Vorteil des folgenden Apparates bedienen (Fig. 1).

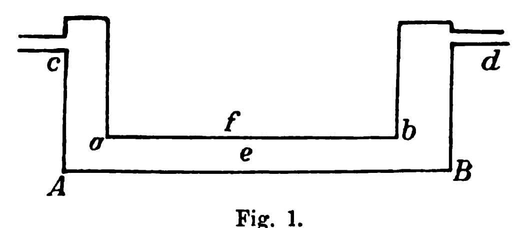


Fig. 1.

Ein doppelwandiger Blechkasten hat eine Durchschnittsform, wie sie aus vorstehender Zeichnung ersichtlich ist; die Flächen (ab) und (AB) sind Glasplatten und zwar trägt die obere (ab) ein System sich rechtwinkelig kreuzender Rinnen. Vermittels der Röhren c und d durchspült im Innern des Kästchens heisses oder später kaltes Wasser die obere Glasplatte und den Raum f, in den das Paraffin und Objekt hineinkommt. Wenn es auf genaue Orientierung ankommt, so ist es gut, den Raum f mit einer Beleuchtungs-

[1]) Sehr bequem ist es auch, wenn man die Einbettung in einer Uhrschale, nicht mit gewölbtem, sondern mit ebenem Boden, der eine Richtungsrinne trägt, vornimmt.

linse zu erhellen; die Zuleitung des heissen oder kalten Wassers erfolgt aus zwei Standgefässen durch zwei getrennte Wasserleitungen, die sich erst kurz vor der einen Röhre c oder d vereinigen und getrennt abgesperrt werden können. Ähnliche Apparate haben viele andere Forscher angegeben.

Orientierung nach Kerr

Auf dem Objekthalter des Mikrotoms selbst orientiert Kerr sein Material und zwar mit Hilfe eines eigens zu diesem Zwecke konstruierten Apparates; das Paraffin wird dabei durch eine Platinschleife, die mit zwei Elementen in Verbindung steht, flüssig erhalten.

nach Noak

Bei der Methode von Noak, die der Verfasser während der Untersuchung von Muscideneiern erfand, wird die Orientierung beim Schneiden und durch das Schneiden selbst vorgenommen. Das Verfahren diente nur dazu, genaue Sagittalschnitte zu bekommen, doch kann man damit auch genaue Quer- und Frontalschnitte erhalten. Es wurde ein sehr präzis gearbeiteter scharfkantiger Metallwürfel von 16 mm Kantenlänge hergestellt, der an der einen Ecke in der Diagonale des Würfels einen Stift von gleichem Metall trägt. Der Würfel passt in den Objekthalter des Yung'schen Mikrotoms hinein. Dieser Objekthalter ist insofern etwas verändert, als die eine seiner beiden Metallplatten nicht einen gewölbten, sondern geraden Rand besitzt. Ist der Würfel im Mikrotom eingespannt, so kann man durch Abzeichnen der Kante dieser geraden Metallplatte des Objekthalters auf der anstossenden Würfelfläche die Stellung, die der Würfel und damit auch das auf seinen Stift angeschmolzene Objekt im Mikrotom gehabt hat, jederzeit wieder erhalten. Die Form des Würfels und seine Anwendung ergibt sich aus den Zeichnungen (Fig. 2—4), die ich nach den Abbildungen der Originalarbeit habe anfertigen lassen, weil ohne dieselben die ganze Methode unverständlich bleiben würde.

Je nach der Stellung, die ich dem Würfel gebe, kann ich das auf dem Stift angeschmolzene Objekt in querer (Fig. 2 a), sagittaler (Fig. 2 c) oder frontaler (Fig. 2 b) Richtung schneiden. Zur Erzielung genauer Sagittalschnitte verfährt man nun so, dass man erst einige Querschnitte von dem Objekt herstellt. „Man markiert nun in der oben bezeichneten Weise die Lagerung des Würfels, nimmt ihn sodann aus dem Objektschlitten heraus und legt ihn dicht neben das Mikroskop eventuell auf dessen Objekttisch und

zwar so, dass die Einbettungsmasse dem Schnitt im Mikroskop entsprechend gelagert ist (Fig. 3). Betrachtet man nun gleichzeitig mit dem einen Auge den Querschnitt im Mikroskop (Fig. 3 a) und mit dem andern den daneben liegenden Würfel (Fig. 3 b), so kann die Dorsoventralrichtung des Objektes ziemlich genau auf der oberen Würfelseite durch einen Strich fixiert werden. . . . Spannt man nun den Würfel derart in den Objektschlitten ein, dass die markierte

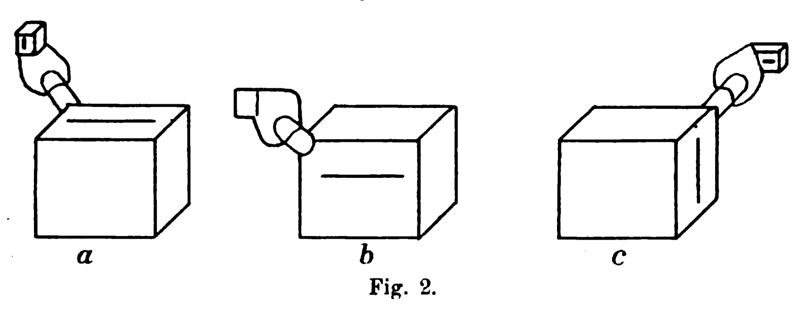


Fig. 2.

Dorsoventrallinie parallel der Schnittrichtung verläuft, so kann man Längsschnitte anfertigen, ohne vorher das Objekt von seiner Unterlage loslösen und in veränderter Lage aufkleben zu müssen. Aber diese Orientierung ist möglicher Weise noch nicht befriedigend.

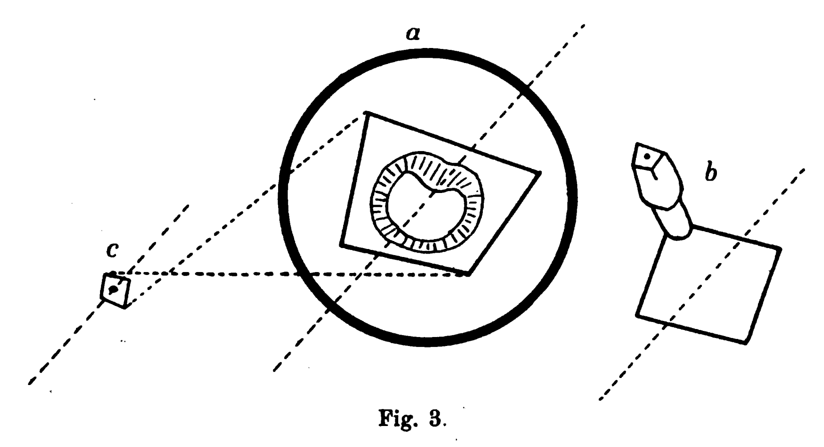


Fig. 3.

Nach Anfertigung weniger Längsschnitte kann man in diesem Fall den Würfel abermals umschalten, indem man ihn wieder in seine erste Lage zurückbringt. Die nunmehr erhaltenen Querschnitte zeigen auf der einen Seite einen Defekt, welcher den vorher ab-

getragenen Längsschnitten entspricht (Fig. 4); man erkennt also die soeben innegehabte Schnittrichtung auf dem nämlichen Bilde neben der gewünschten Dorsoventralrichtung; eine eventuelle Korrektur der Markierungslinie auf dem Würfel kann nun mit fast mathematischer Genauigkeit vorgenommen werden". (Noak).

Orientierung nach Jordan

Bei dem Apparat von Jordan (Fig. 5, S. 45) ragt durch den Boden des Einbettungsgefässes eine Kugel mit einem ihrer Abschnitte

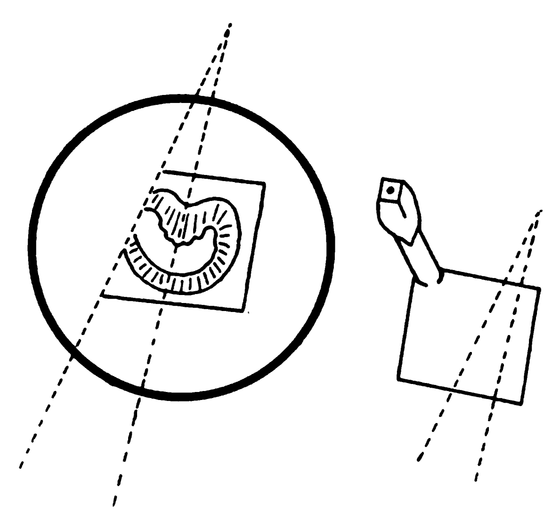


Fig. 4.

in den Einbettungsraum hinein, der durch Auflegen von zu dem Boden und zu einander senkrechten Metallrahmen gebildet ist. Sie ist in ihrer Öffnung frei beweglich, kann aber in einer bestimmten Stellung festgestellt werden. Das Objekt ist so weit fertig, dass es nur mit Paraffin durchtränkt zu werden braucht. Es wird auf die Kugel gebracht und durch Drehen derselben orientiert, wobei man sich nach den Rändern der Metallrahmen richtet. Dann giesst man Paraffin in den Einbettungsraum und stellt das Ganze zur Durchtränkung in den Paraffinofen. Später hebt man den Block von dem Rahmen, der Kugel und dem Boden des Einbettungsgefässes ab. Die Vorbereitung des Objektes geschieht in folgender Weise: Es wird aus dem flüssigen Paraffin genommen, auf einen mit Glyzerin bestrichenen Objektträger gelegt und in den Thermostaten gebracht. Aus dem sich um das Präparat bildenden Paraffintropfen wird es

heraus auf die seitlichen Teile des Objektträgers geschoben und dann auf Fliesspapier gebracht.

Man umgibt es nun mit einem Tropfen des folgenden Gemisches: Cedernholzöl 1, Äther 1, Alkohol 1, Collodium simplex 3. Durch das Fliesspapier wird der Überschuss dieser Mischung aufgenommen. Die Kugel ist vorher mit etwas Gummi arabicum bestrichen worden. Wenn der Kollodiummantel des Objektes fest geworden ist, bringt man dasselbe auf die Kugel und zwar in einen Tropfen des Cedernholzöl-Kollodiums und orientiert unter der Lupe. Dann weiter, wie eben beschrieben.

Orientierung nach O. Hertwig

Die Eier und Larven von Synapta digitata orientierte Semon nach der Angabe von O. Hertwig dadurch, dass er sie vor der Einbettung mit Eiweiss-Glyzerin (Paul Mayer) auf Leberstückchen aufklebte. O. Hertwig selbst brachte das zu schneidende Froschei in eine mit dem Kopf einer Stecknadel gemachte Vertiefung eines Würfels aus Calberla'scher Eiweissmasse, nachdem er dieselbe mit etwas flüssiger Eiweisslösung benetzt hatte. War in ihr das Ei orientiert, so setzte er vorsichtig etwas absoluten Alkohol auf das Ei. Dadurch gerann das Eiweiss und fixierte das Ei.

nach Samter

Samter ging folgendermafsen zu Wege. Eine Eihaut des rohen Hühnereies wird über einen Metallrahmen gespannt, ein der Grösse des einzubettenden Objektes entsprechendes Loch in dieselbe gemacht und dieses von unten mit Fischleim verschlossen. Durch Eintauchen der Haut in 50proz. Alkohol wird dieser zähflüssig. Nun bringt man den Rahmen unter das Mikroskop und legt das Objekt in das Loch der Membran auf den Fischleim; wenn man jetzt die Haut in 63proz. Alkohol taucht, gerinnt der Fischleim und hält das Objekt in dem Loche in der ihm gegebenen Lage fest. Man schneidet die Eihaut so zu, wie das Objekt geschnitten werden soll und bettet sie mit dem Präparat zusammen ein. Beim Schneiden richtet man sich nach der Form der Eihaut; der Fischleim wird mit vom Paraffin durchtränkt und stört beim Schneiden nicht.

Die Methoden von Field und Martin und v. Davidoff, Patten, Woodworth und Hoffmann haben das Gemeinsame, dass die Objekte vor dem Einschluss in Paraffin auf eine Unterlage geklebt werden, die später nach der Einbettung vom Block wieder entfernt wird, auf ihm aber bestimmte Marken zurücklässt, nach denen man sich beim Schneiden richtet.

nach Field und Martin

Field und Martin stellen erst folgendes Einbettungsgemisch her: Sie trocknen Celloidinplatten stark und durchtränken sie mit Toluol; dann giessen sie vorsichtig eine vorher bereitete Lösung von Alkohol und Toluol zu gleichen Teilen hinzu. Die so erhaltene Mischung muss die Konsistenz des Nelkenöls haben. Nun wird in ihr unter gelindem Erwärmen Paraffin so lange gelöst, bis die Flüssigkeit bei höheren Zimmertemperaturen (20—25° C.) eine konzentrierte Paraffinlösung darstellt.

Vor der Einbettung schneiden sich nun Field und Martin aus einer 0,1 mm dicken Gelatinetafel ein kleines rechteckiges Stück heraus, dass sie auf einen Objektträger unter eine Lupe legen; in einem Tropfen des eben erwähnten Einbettungsgemisches kommt das Objekt auf die Gelatine und wird in ihm mit einer Nadel orientiert. Dabei richten sie sich nach den Rändern der Gelatine oder nach einem auf der Unterseite derselben angebrachten Kreuz. Nun lässt man genau von oben auf das Objekt einen Tropfen einer Mischung von Chloroform und Paraffin fallen; das Chloroform schlägt das Kollodium nieder und dadurch wird das Objekt in der ihm durch die Orientierung gegebenen Lage fixiert. Weiterhin bettet man die Gelatine mit dem Objekt zusammen ein. Man orientiert auf dem Mikrotom nach der Gelatinetafel; hat man vorher den Block so zugeschnitten, dass die Ränder der Tafel freiliegen, so kann man diese durch Eintauchen in warmes Wasser leicht entfernen, sodass das Objekt schliesslich nur von einer ganz dünnen Paraffinschicht umgeben ist.

nach v. Davidoff

v. Davidoff orientiert die Embryonen von Distaplia magnilarva in ähnlicher Weise; er beschreibt seine Methode folgendermafsen: „Ich nehme einen Objektträger und trage auf denselben eine dünne Schicht Glyzerin auf, dann bringe ich mit einem Pinsel einen Tropfen einer dicken Kollodiumlösung darauf und suche denselben in einer dünnen Lage etwa auf eine Fläche von $^1/_2$ qcm auszubreiten. Das Kollodium wird fest und stellt dann ein sehr dünnes, vollkommen durchsichtiges Plättchen dar. Jetzt bestreiche ich das Kollodiumplättchen mit irgend einer Wasserfarbe (man kann selbst Boraxkarmin hierzu nehmen), jedoch derart, dass ein mittleres Feld frei von Farbe bleibt. Nachdem die Farbe getrocknet ist, bringe ich aus Xylol den zu orientierenden Embryo auf das mittlere durchsichtige Feld des Plättchens und gebe ihm unter dem Präparier-

mikroskop mit Nadeln die gewünschte Lage. Nun trockne ich das um den Embryo noch vorhandene Xylol mit Fliesspapier ab, nehme einen Tropfen einer dünnen Kollodiumlösung und bringe ihn mit einem Pinsel an den Rand des Embryo. Das Kollodium umfliesst denselben und fixiert ihn an das Plättchen. Nun ziehe ich letzteres vom Objektträger ab, was sehr leicht geschieht und übertrage es in Xylol. Hier wird das Mittelfeld, auf welchem der Embryo fixiert ist, in etwa $^1/_4$ Stunde vollkommen durchsichtig. . . . Durch ein passendes Zuschneiden des gefärbten Randes des Plättchens mit einem scharfen Skalpell kann ich die Schnittrichtung bestimmen. Sammt dem dünnen Kollodiumplättchen wird der Embryo in Paraffin eingebettet; beim endgültigen Orientieren auf dem Objektschlitten des Mikrotomes muss man aber dafür sorgen, dass er gegen die Schneide des Messers gekehrt ist, derart also, dass das Messer zuerst ihn trifft und nachher das Kollodiumplättchen. Es ist dies eine Vorsichtsmafsregel, welche nicht unbedingt notwendig ist; da aber das Paraffin sich zuweilen hinter dem Plättchen ablöst, so könnte dieses dem Objekte schaden, wenn es nicht in der eben gesagten Weise orientiert wäre".

nach Patten

Patten verwendet als Unterlage, auf welche die Objekte geklebt werden, Streifen von entweder geripptem oder glattem Papier. In letzterem Falle zeichnet er mit dem Bleistift auf dasselbe ein System sich kreuzender Linien. Das Material, das in Nelkenöl oder Bergamottöl liegt, kommt auf die Rinnen oder Bleistiftlinien in einem Tropfen Nelkenöl-Kollodium. Hierin werden sie orientiert und dann durch Terpentinzusatz in ihrer Lage fixiert. Nun werden die Papierstreifen mit den Objekten in Paraffin eingebettet. Nach der Abkühlung lassen sie sich leicht von dem Paraffinblock abziehen, während das Material in demselben zurückbleibt. Die Rinnen und Linien markieren sich auf der Unterseite des Blockes und nach ihnen richtet man sich beim Schneiden.

nach Woodworth

Die Methode von Woodworth ist eine Modifikation der Patten'schen und kompliziert dieselbe, wie Patten meint, unnötigerweise. Auch W. gebraucht ein Papier mit geriefter Oberfläche, aus dem er sich rechteckige Stückchen zurechtschneidet und zwar so, dass die Rinnen des Papiers die Schmalseiten des Kärtchens unter rechtem Winkel treffen. Dieses klebt er mit seiner glatten Fläche mit Hilfe von Gummi arabicum auf einen Objektträger und

überzieht dann auch die nach oben gekehrte rauhe Papierfläche mit dünnem Gummi arabicum. Sodann kommt auf diese obere Fläche noch ein sehr dünner Kollodiumüberzug. Die Kollodiumlösung, die hiezu dient, wird dadurch bereitet, dass man 1 Teil des gewöhnlichen Kollodiums mit 3 Teilen Äther verdünnt. Das zu orientierende Material wird in Terpentin gebracht; den Überschuss des letzteren saugt man mit Fliesspapier ab und bringt dann das Objekt auf das Papier, auf dem man nach den Rinnen orientiert. Sodann legt man Objektträger und Objekt unter eine Glasglocke und setzt beides für einige Sekunden Ätherdämpfen aus. Dadurch wird das Kollodium weich und fixiert das Objekt, dann kommt auf dasselbe ein Tropfen Terpentin und schliesslich Objektträger + Papier + Objekt in das Paraffinbad. Ist die Durchtränkung vollzogen, so legt man auf den dem Paraffin entnommenen Objektträger die Einbettungsrahmen entlang den Seiten des Papiers und bettet ein. Den Paraffinblock schneidet man so zu, dass die Kanten des Papiers frei liegen und bringt ihn dann in warmes Wasser, wodurch sich unter Auflösung des Gummi arabicums das Papier sowohl vom Objektträger wie vom Paraffin löst. Die Rinnen auf der Unterseite des letzteren dienen wieder als Merkmal beim Schneiden.

nach Hoffmann

Hoffmann hat zwei Verfahren angegeben; bei beiden vertritt ein Glasstreifen die Stelle des Papiers der eben beschriebenen Methoden. Die Orientierung wird bei seiner ersten Methode in einem grossen Tropfen Nelkenöl-Kollodium vorgenommen; das letztere stellt er sich dadurch her, dass er „ein Gemisch von gleichen Teilen Kollodium und Nelkenöl an einem zugigen Orte in einem weithalsigen Fläschchen 24 Stunden stehen lässt“. Nach der Orientierung, die mit einer Nadel oder dadurch bewirkt wird, dass man ein Deckgläschen mit Rollen auflegt und nun das Objekt durch vorsichtiges Verschieben dieses Deckgläschens in die gewünschte Lage bringt, kommt der Glasstreifen für kurze Zeit in Xylol und dann auf etwa 5 Minuten in Paraffin. Der Aufenthalt in dem Xylol muss so lange währen, bis der Kollodiumtropfen erstarrt ist. Dies geht im allgemeinen schnell vor sich; orientiert man aber, wie erwähnt, mit Hilfe eines Deckglases, so dauert dies oft einige Stunden, „da das Deckgläschen die Kommunikation mit dem Xylol nur seitlich zulässt.“ Unerwünscht ist für viele Fälle bei dieser Art des Vorgehens, die mit dem Verweilen in Nelkenöl-Kollodium

verbundene Aufhellung des Objektes; daher orientiert H. nach seiner zweiten Mitteilung unter 90 proz. Alkohol. Das Material wird mit dickem Celloidin, dem etwas Nelkenöl zugesetzt ist, durchtränkt, kommt in einem Tropfen dieser Flüssigkeit auf den Glasstreifen und wird unter 90 proz. Alkohol orientiert. Dann bringt man den Glasstreifen in Xylol, bis das Celloidin fest und durchsichtig geworden ist und bettet zum Schluss in Paraffin ein.

Übergang aus dem Intermedium in das Paraffin

Übergang aus dem Intermedium in das Paraffin. Für die grosse Mehrzahl der Fälle genügt es, zwischen dem Intermedium und dem weichen Paraffin eine Mischung beider zu gleichen Teilen einzuschalten, um einen vorsichtigen Wechsel zwischen Intermedium und Paraffin zu erzielen. Wenn es aber besonders zarte Objekte sind, muss man den Übergang noch schonender gestalten; man kann dies am besten durch Anwendung mehrerer Mischungen von Paraffin und Intermedium erreichen, bei denen der Paraffingehalt allmählich steigt. Weniger zweckmäfsig ist die Methode von

1. nach Bütschli und Blochmann

Bütschli und Blochmann, die bei Verwendung nur einer Paraffinsorte das Objekt auf die Weise in letztere einbetten, dass sie das Chloroform der Chloroform-Paraffinmischung im Ofen verdunsten lassen. Wenn aber nur eine Spur von Chloroform im Einbettungsparaffin enthalten ist, wird dieses bröckelig und lässt sich schlecht schneiden. Will man ihnen also folgen, so ist es gut, das Material, selbst wenn das Chloroform scheinbar ganz verdunstet ist, noch in reines Paraffin zu bringen. Als eine ausgezeichnete Methode

2. nach Yenkinson

rühmt Loisel diejenige von Yenkinson. Man bringt in eine Abdampfschale zu $^2/_3$ flüssiges Paraffin hinein und kühlt ab; es erstarrt zu einem Kuchen mit ebener Oberfläche. Auf diese kommt Chloroform und da hinein das Objekt. Auf einem Ofen lässt man die Schale 12 Stunden stehen. Es ist dann ein Teil des Chloroforms verdampft, ein anderer hat sich mit Paraffin gesättigt und in ihm liegt das Objekt. Dann bringt man dasselbe in reines Paraffin.

Einbettung in Celloidin-Paraffin (doppelte Einbettung)

Einbettung in Celloidin-Paraffin. Bei dieser sogen. doppelten Einbettung wird das Objekt zuerst mit Photoxylin oder Celloidin und dann mit Paraffin durchtränkt, ein Verfahren, welches ganz besonders beim Studium älterer Embryonen gute Dienste leistet.

1. nach Kultschitzky

Kultschitzky ging folgendermafsen zu Wege. Sein Material kam aus dem absoluten Alkohol in

1. Alkohol und Äther āā auf einige Stunden,
2. eine beliebig starke, aber dünne Celloidinlösung für 24 Stunden,
3. Origanonöl,
4. eine Mischung dieses Öles mit Paraffin, die auf höchstens 40 ° C. erwärmt wurde,
5. reines Paraffin.

2. nach Ryder

3. nach Koncewicz

4. nach Gilson

Statt des Origanonöles empfiehlt Ryder die Anwendung des Chloroforms und Koncewicz gebraucht eine ganz bestimmte Photoxylinlösung, nämlich von 0,5—1,5 %. Um das Eindringen des dünnen Celloidins oder Photoxylins zu beschleunigen, kochte Jde nach dem Vorgang von Gilson das Material in der dünnen Kollodiumlösung. Seine Zeitangaben sind die folgenden:

1. Mischung von Alkohol und Äther 15 Minuten,
2. Kochen in verdünntem Kollodium 30 Minuten,
3. Mischung von Chloroform und Paraffin, 15 Minuten lang erwärmt, sodass aus ihr das Chloroform verdunstet,
4. reines Paraffin 15 Minuten.

5. nach Field u. Martin

Field und Martin durchtränken die Objekte gleichzeitig, nicht nacheinander, wie es gewöhnlich geschieht, mit Celloidin und Paraffin; sie verfahren folgendermaßsen: Aus dem absoluten Alkohol kommt das Objekt in

1. absoluten Alkohol und Toluol āā auf einige Stunden,
2. eine Lösung von Celloidin und Paraffin in dem eben genannten Alkohol-Toluolgemisch.

Über ihre Herstellung s. S. 39. Nun kann weiter in doppelter Weise verfahren werden, entweder kommt das Material

3. in einer kleinen Masse dieses Paraffin-Celloidingemisches in das mit Paraffin gesättigte Chloroform und wird schliesslich unter langsamem Verdunstenlassen des Chloroforms eingebettet, oder
4. in ein Fläschchen, in welches man soviel von dem Celloidin-Paraffingemisch hineingiesst, dass das Objekt gerade bedeckt wird; nun fügt man so lange reines Paraffin hinzu, bis der Inhalt des Fläschchens aus reinem Paraffin besteht.

Wenn man dem oben erwähnten Paraffin-Celloidingemisch etwas Kampher hinzufügt, so löst sich nach den Angaben der Verfasser etwas mehr Paraffin. Der eine der beiden Autoren (Martin) gibt folgende Methode an. Die Objekte werden in einem Gemisch von Kampher und Celloidin durchtränkt, kommen dann in eine gesättigte Lösung von Kampher und Chloroform und dann in reines Paraffin.

6. nach Martin

7. nach Jordan

Jordan hat zwei Methoden angegeben, einmal „zur Einbettung des Celloidins in Paraffin auf herkömmliche Weise“ und dann „um eine Durchtränkung von Celloidin mit Paraffin ohne Anwendung hoher Wärmegrade zu erreichen.“

Methode I. Die Objekte werden mit folgender Mischung durchtränkt:

2—3 proz. Celloidin . . . 4 T.
Cedernholzöl . . . . . 1 „,

wobei die Celloidinlösung in gewöhnlicher Weise mit Hilfe von Alkohol-Äther hergestellt ist. Dann kommen sie in

Chloroform . . . . . . 4 T.
Cedernholzöl . . . . . 1 „,

welche Mischung mehrmals gewechselt wird. „Nun in eine Mischung von Paraffin und Chloroform oder Benzol mit einigen Tropfen Cedernöl, wo sie bei etwa 30 ° C. bis zur Durchtränkung bleiben. Nun in reines Paraffin, welches auch mehrmals zu wechseln ist und nicht zu lange einwirken soll. Zeitmafse angeben ist unmöglich, da diese zu sehr von der Grösse der Stücke abhängen.“

Methode II. Man durchtränkt die Objekte in gewöhnlicher Weise mit Celloidin, dem man aber auf je 4 T. 1 T. Cedernöl zusetzt; danach bringt man sie in

8 proz. Celloidin . . . . 5 T.
Cedernöl . . , ... 1 „

und zwar in einer Papierform, die man Chloroformdämpfen aussetzt. Hat sich eine Haut gebildet, so taucht man die Papierform in

Chloroform . . . . . . 5 T.
Cedernöl . . . . 1 „,

hierin wird der Block nach einiger Zeit, innerhalb welcher die Flüssigkeit mehrmals gewechselt werden muss, die zum Schneiden nötige Härte bekommen. Dieser Block nun „wird in eine möglichst konzentrierte Lösung von Paraffin von etwa 50 ° Schmelzpunkt

(doch kann dieser für verschiedene Objekte verschieden sein) in Benzol oder Toluol etc., der man wenige Tropfen Cedernholzöl zusetzt, gebracht; das Ganze setzt man der Maximaltemperatur aus, die man für zulässig hält; ich wende 30 ° C. an. Mit dieser Mischung durchtränkt man das Objekt möglichst gründlich, nimmt dann den Deckel des Gefässes ab, damit das Benzol oder was es sonst sei, verdunste; man kann auch noch einmal die Lösung wechseln, indem man dann das Cedernöl weglässt, doch ist dies Verfahren nur bei Objekten anzuwenden, die von Natur nicht sehr konsistent und hart sind. Ist die ganze Lösung nun breiartig geworden, so nimmt man den Block heraus, um nun noch den Rest des Lösungsmittels verdunsten zu lassen. Je gründlicher das geschieht, desto besser schneidet sich das Objekt."

Spezielle Angaben über die Einbettung einiger Objekte.

Spez. Angaben über die Einbettung einiger Objekte

1. Echinodermen

nach Boveri

Echinodermen. Bei der Kleinheit der Eier kommt es darauf an, im Paraffinblock eine grosse Anzahl derselben dicht bei einander liegen zu haben, damit möglichst viele zu gleicher Zeit geschnitten werden. Dies erreicht Boveri dadurch, dass er die Eier in eine Haut einwickelt und sie mit dieser zusammen einbettet und schneidet. Er gebraucht dazu die abgeworfenen Epidermisfetzen von Cryptobranchus. Denselben Zweck erreicht man auch dann, wenn sich die Eier innerhalb des Einbettungsparaffins in engen Röhrchen (O. Hertwig) oder sehr stark gewölbten Schalen (Reinke) zu Boden senken. Sie

nach O. Hertwig und Reinke

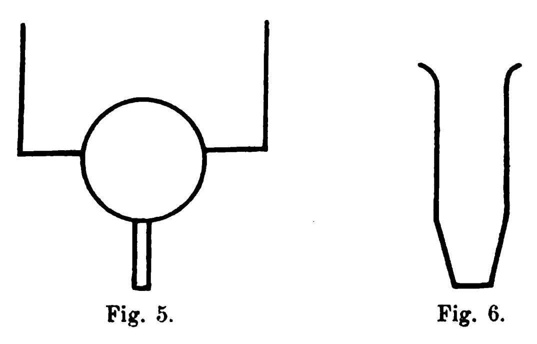


Fig. 5. Fig. 6.

liegen dann dicht an der Oberfläche des Blockes eng bei einander. Ich selber habe mir Röhrchen verfertigen lassen, die keinen gewölbten, sondern einen keilförmig zulaufenden Boden haben (Fig. 6).

nach Röthig

Es liegen dann die Eier auf dem Grate und im Block unter der Kante desselben; die Schnittrichtung ist dann gegeben durch die zur Kante senkrechte Fläche. Was das Herausnehmen des Blockes aus den Röhrchen betrifft, so verfährt man am besten in der Weise, dass man vor dem Einschütten des Paraffins in das Röhrchen eine Mischung von Glyzerin-abs. Alkohol ãã bringt und dann wieder ausschüttet. Die dünne Schicht, welche die Wände benetzt, ermöglicht das Loslösen des Paraffins. Bettet man im oberen Teile der Paraffinsäule einen Faden mit ein, so kann man an ihm den Block nach dem Erstarren leicht aus dem Röhrchen herausziehen.

nach Reinke

Reinke bringt die Eier aus dem absoluten Alkohol in Xylol, dann auf $^1/_2$—1 Stunde in sehr weiches, auf 1 Minute in sehr hartes Paraffin.

2. Vermes

Vermes

Thysanozoon

Turbellaria. O. van der Stricht gibt an, dass man bei Thysanozoon das Material nur 10 Minuten im absoluten Alkohol lassen darf, weil sonst die Schale zu hart wird. Ferner muss die Durchtränkung mit Chloroform und Paraffin allmählich, aber schnell erfolgen. Die Einbettung muss in $^3/_4$—1 Stunde fertig sein.

Cerebratulus

Nemertini. Lee empfiehlt zur Einbettung sein Cedernöl; Coe wandte bei den Eiern von Cerebratulus die Methode von Boveri an, indem er die Objekte in ein Stückchen Epidermis vom Frosch oder Salamander einwickelte.

Rhabditis nigrovenosa

Askaris

a) nach Bonnevie und Fürst

Nematoden. Was die Einbettung von Rhabditis nigrovenosa anbetrifft, so gibt Nussbaum an, dass dieselbe im Paraffin bei nur höchstens 50 ° C. vorgenommen werden darf und dass der Ersatz von Alkohol durch Xylol oder von Xylol durch Paraffin ganz allmählich und behutsam erfolgen muss. Das Gleiche ist bei Askaris der Fall. Auch hier muss die Einbettung so schonend wie möglich gemacht werden; die Misserfolge, die man mit diesem so schwer zu behandelnden Objekte so leicht erhält, rühren nach meinen Erfahrungen ebenso oft von einer fehlerhaften Einbettung wie von einer ungenügenden Fixation her. Eine sehr lange dauernde Einbettung nehmen Bonnevie und Fürst vor; der letztere brachte sein Material in Xylol und fügte mehrmals am Tage einige Wochen hindurch demselben bei Zimmertemperatur einige Stückchen Paraffin

zu bis zur Sättigung; darauf liess er erst auf dem Heizkörper der Zentralheizung, dann im Paraffinofen das Xylol aus dieser Mischung verdunsten und erst, wenn das geschehen war, kamen die Objekte in reines Paraffin.

b) nach Röthig

Ich selber gehe folgendermaſsen vor: Entweder lasse ich die Objekte durch Übereinanderschichten von Chloroform und absolutem Alkohol ganz langsam aus dem Alkohol in das Chloroform hinabsinken oder ich bringe sie der Reihe nach in verschiedene Chloroform-Alkoholmischungen. So bleiben die Objekte in einer Mischung von Alkohol abs. und Chloroform āā 12 Stunden, in einer solchen von Alkohol abs. $^1/_3$-Chloroform, $^2/_3$ 2 Stunden und kommen dann in reines Chloroform. Aus diesem bringt man sie auf dem Paraffinofen in Chloroform $^2/_3$-Paraffin (42 ^{0}), $^1/_3$ auf 2 Stunden; dann auf die gleiche Zeit in Chloroform-Paraffin āā, sodann in Chloroform $^1/_3$-Paraffin (42 ^{0}), $^2/_3$ die Nacht über. Am nächsten Tage werden die Schläuche in diesem Gemisch auf 15 Minuten in den Paraffinofen offen gestellt; dann kommen sie auf je 1 Stunde in

1. Paraffin (42 ^{0}),
2. Paraffin (42 ^{0}) $^2/_3$-Paraffin (58 ^{0}) $^1/_3$,
3. Paraffin (42 ^{0}) $^1/_3$-Paraffin (58 ^{0}) $^2/_3$,
4. Paraffin (58 ^{0}).

Es ist von Vorteil, bei allen diesen Prozeduren die Schläuche in die Medien hineinzuhängen.

c) nach Kostanecki u. Siedlecki

Ähnlich verfuhren Kostanecki und Siedlecki. Die Objekte liegen in abs. Alkohol; sie kommen in

1. Chloroform 1-abs. Alkohol 2,
2. Chloroform 2-abs. Alkohol 1,
3. reines Chloroform,
4. in eine bei Zimmertemperatur gesättigte Lösung von Paraffin (48 ^{0} C.) in Chloroform,
5. in eine ebensolche bei 30 ^{0} C. gesättigte Lösung.

„Dann liessen wir die Temperatur auf 40 ^{0} C. allmählich steigen und übertrugen die Objekte in Chloroform-Paraffin āā, nach einigen Stunden bei steigender Temperatur in Paraffin-Chloroform (3 : 1) und endlich in Paraffin von 48 ^{0} C., dann in ein Gemenge von 2 Paraffinsorten (48 ^{0} und 52 ^{0} C.), worauf sie eingebettet wurden. Hierbei muss man beachten, dass die Eier nicht länger als höchstens

8 Stunden der Temperatur über 35 ° C. ausgesetzt werden, sonst treten starke Schrumpfungen ein".

d) nach Lukjanow

Lukjanow bringt die Schläuche aus dem abs. Alkohol in

1. Alkohol-Äther ää auf 24 Stunden,
2. in eine 3—5 proz. Lösung von Photoxylin für 24 Stunden,
3. in Origanonöl bei 38 ° C. für 12 Stunden,
4. in Paraffin und Origanonöl bei 38 ° C. auf 12 Stunden,
5. in reines Paraffin (40 ° C.).

Echinorhynchus

Bei den Acanthocephalen bettet Kaiser, dessen Untersuchungsobjekt Echinorhynchus war, in folgender Weise ein. Das Material kommt aus dem absoluten Alkohol in eine Mischung von Alkohol abs. 2-Benzol 1. Zu derselben fügt man alle Stunde je 1 ccm Benzol so lange hinzu, bis ihr Gesamtvolumen das 5fache des ursprünglichen beträgt. Sodann kommen die Objekte in reines Benzol, darauf in eine kaltgesättigte Lösung von hartem Paraffin in Benzol. Diese kommt in den Thermostaten (50—52 °) und in Zwischenräumen von 10 Minuten werden 2—3 Tropfen flüssigen Paraffins hinzugesetzt bis zum 3fachen der ursprünglichen Flüssigkeitsmenge. Nun bringt man das Material auf $^1/_2$ bis $1^1/_2$ Stunden in reines Paraffin.

Myzostoma

Angaben über das Einbetten der Anneliden geben unter anderem Wheeler (Polychaeten) und Gathy (Oligochaeten). Der erstere nimmt bei Myzostoma die Einbettung in demselben Uhrschälchen vor, in welchem er auch fixierte. Die Eier kleben nämlich nach Zusatz der Fixierungsflüssigkeit fest am Glase, sodass man sie in demselben waschen, mit Alkohol und Xylol behandeln und schliesslich in Paraffin einbetten kann. Gathy verfährt bei Tubifex (und ebenso bei Clepsine) auf zwei Weisen.

Tubifex und Clepsine

I. Einbettung mit Hilfe von Chloroform nach Carnoy und Lebrun. Das Material liegt in 95 proz. Alkohol; kommt dann in folgende Mischung:

95 °/₀ Alkohol . . .	$^1/_4$
100 °/₀ Alkohol . . .	$^1/_4$
Chloroform	$^1/_2$,

darauf in Chloroform (5 Minuten) und Chloroform-Paraffin ää bei Körpertemperatur. Der Aufenthalt in reinem Paraffin darf bei Celpsine $1^1/_2$—2 Minuten nicht übersteigen, bei Tubifex muss man

ihn noch geringer wählen. Man bringt in letzterem Falle das Material aus der Chloroform-Paraffinmischung in reines Paraffin und bettet sofort darin ein.

II. Einbettung mit Hilfe von Terpentin. Das Material kommt nacheinander in

1. 95 proz. Alkohol 5 Minuten,
2. 100 proz. Alkohol 2—3 Minuten,
3. abs. Alkohol-Terpentin āā 5 Minuten,
4. Terpentin 5 Minuten,
5. Terpentin-Paraffin 1 Stunde,
6. Paraffin 2—3 Minuten.

Letzteres Verfahren eignet sich besonders für die grösseren Eier von Clepsine und für abgelegte Eier von Tupifex.

Arthropoden

3. Arthropoden

Ovarien

Stuhlmann legt die Ovarien von Insekten, Spinnen, Myriapoden und Peripatus auf mehrere Stunden in Chloroform, dann auf 1 bis 3 Tage in geschmolzenes Paraffin von ca. 55° C.; Cholodkowsky lässt die Eier von Blatta germanica im grünlichen Cedernöl 24 Stunden, wobei er das Öl einmal wechselt. Aus diesem kommen sie in Paraffin (52° C.) auf 3—5 Stunden bei einer Temperatur von 55—60° C.

Blatta germanica

nach Henking

Henking erweicht die Insekteneier, um eine bessere Schnittfähigkeit des Dotters zu bekommen, vor der Einbettung dadurch, dass er sie nach der Färbung mit Boraxkarmin auf 12 Stunden in

Alkohol 70 %	20 ccm
Salzsäure conc.	1 Tropfen
Pepsin	1 Messerspitze

bringt. Dann kommen sie der Reihe nach in absoluten Alkohol, Alkohol-Bergamottöl āā, Bergamottöl, Bergamottöl-Paraffin, reines Paraffin.

Mollusken

4. Mollusken

Limax

Die Eier von Limax bettet Meisenheimer folgendermaſsen ein. Der Alkohol muss von 10 zu 10 % verstärkt werden; die Überführung in Chloroform geschieht durch Übereinanderschichten von Alkohol und Chloroform, das allmähliche Durchtränken mit Paraffin (54—56° C.) durch Abdunstenlassen des Chloroforms aus einer Chloroform-Paraffinmischung.

Radula

Bei der schwer mit Paraffin zu durchtränkenden Radula muss nach Rössler und Rottmann so verfahren werden, dass, um zunächst Rössler zu folgen, das Material aus dem abs. Alkohol in gelbes Steinkohlenbenzol kommt, dem erst in der Kälte, dann in der Wärme Paraffin zugesetzt wird. Schliesslich reines Paraffin. Terpentin ist als Intermedium nicht zu gebrauchen, weil in ihm das Chitin sehr hart und spröde wird. Rottmann lässt seine Objekte 24 Stunden in abs. Alkohol, 2 Stunden in Xylol, $^1/_2$ Stunde in einer Lösung von Paraffin in Xylol und 1 Stunde in reinem Paraffin; der Aufenthalt im Intermedium und im Paraffin darf nur kurz sein, weil sonst der Dotter zu hart wird.

5. Pisces Amphioxus nach Samassa

Pisces Amphioxus[1])

Samassa bettet nach einer etwas modifizierten Field-Martin'schen Methode ein. Die Objekte sind mit Boraxkarmin gefärbt, kommen aus dem abs. Alkohol in Toluol 2, abs. Alkohol 1, Äther 1; dann in das gleiche Gemisch. das aber sowohl mit Paraffin wie mit Celloidin gesättigt ist, für 24 Stunden. Sie werden daraut in dieser Flüssigkeit auf eine Glasplatte gebracht, „die etwa $^1/_2$ Stunde an der Luft stehen bleibt, wobei sich auf der Flüssigkeit eine Celloidinhaut bildet. Dann wird die Platte in Petroleumäther gebracht, wo die Einbettungsmasse nach kurzer Zeit erstarrt und ein weisslich-bläuliches Aussehen bekommt. Man kann nun die Einbettungsmasse, die eine zusammenhängende Platte bildet, vom Glas ablösen, lässt sie einen Tag in Petroleumäther und verbringt sie dann in Paraffinöl, wo sie sich vollkommen aufhellt. Die Objekte sehen genau so aus, wie wenn sie direkt in Paraffinöl lägen und man kann sie, sofern dies die Dicke der Celloidinplatte nicht hindert, mit den stärksten Vergrösserungen betrachten. Orientiert man dann das Objekt auf einem Objektträger, auf dem man gerade Striche eingeritzt hat, so kann man das Objekt in bestimmter Form aus der Platte herausschneiden und dadurch eine Achse kenntlich

[1]) Die Eier von **Petromyzon** bettet Lubosch (Jen. Zeitschr. Naturw. Bd. 38 1903) folgendermassen ein: Sie kommen aus dem 90proz. Alkohol „auf 15' in 96proz. Alkohol, dann auf 5' in Alk. abs., dann in ein Gemisch von Alk. abs. + Chloroform aa. Hier sinken die Eier zu Boden. $^1/_2$ Min., nachdem sie zu Boden gesunken sind, kommen sie in reines Chloroform, dem man nach einigen Minuten das gleiche Volumen Paraffin zusetzt. In 3 Stunden löst sich das allmählich auf und es kommen nun die Eier auf 2—5 Minuten in Paraffin, in dem sie sofort eingeschmolzen werden" (p. 677).

machen. . . . . . . Die Objekte kommen aus dem Paraffinöl direkt in Paraffin."

Burchardt wendet zur Einbettung Xylol und ein Paraffin an, das mehrere Paraffine von verschiedenem Schmelzpunkt enthält. Seine Paraffinmasse besteht aus

nach Burchardt

1. Paraffin 40° 10 T,
2. Paraffin 45° 1 T.,
3. Paraffin 52° 1 T.,
4. Paraffin 58° 1 T.,
5. Paraffin 60° 6 T.

Sobotta wickelt die Eier in ein Stück Amnionhaut ein und kann so eine ganze Anzahl mit einem Male scheiden.

nach Sobotta

Wenn man bei der Untersuchung der Eier der Teleostier sich der Methode von H. Virchow bedient, so braucht der vom Dotter befreite Keim nur ganz kurze Zeit in Paraffin zu verweilen; es genügt nach Behandlung mit Chloroform und Chloroform-Paraffin ein Aufenthalt von nur $^1/_2$—1 Minute im reinen Paraffin.

Teleostier

Amphibien

6. Amphibien

Über die Einbettungsart der Amphibieneier liegen viele technische Angaben vor. Nach Born hat die Fixation einen grossen Einfluss auf die Schneidbarkeit; nach ihm schneiden sich am besten die in Chrom-Essigsäure gehärteten Eier, schlechter die mit heisser $^1/_3$ proz. Chromsäure und am schlechtesten die mit Sublimat behandelten Objekte. Er leugnet den Einfluss des Innehaltens gewisser Zeiten, während welcher die Eier im Alkohol, dem Intermedium und dem Paraffin liegen, auf die Schneidbarkeit vollständig, während ihn O. Schultze scharf betont. Nach O. Schultze kommen die Eier aus dem mehrmals gewechselten 95 proz. Alkohol in Terpentin auf 1—2 Stunden, dann in Paraffin (50°) $^1/_2$—1 Stunde. Eine andere von ihm angegebene Methode ist die, dass die mit Formalin fixierten Eier aus dem 95 proz. Alkohol auf 2 Stunden in Bergamottöl und auf 10 Minuten in einmal gewechseltes Paraffin kommen. Ebenso verfahren Fick und Ziegler, von denen Fick die Eier 2 bis 4 Stunden in Bergamottöl, $^1/_2$—1 Stunde in Paraffin (50°) lässt, während Ziegler nach einer 2stündigen Bergamottöl-Behandlung einen Aufenthalt von 20 Minuten im Paraffin für genügend erachtet.

nach O. Schultze

nach Fick und Ziegler

nach Adler (Bufo)

Die Eier von Bufo vulg. können nach Adler im $99^{8}/_{10}$ proz. Alkohol, Chloroform und Chloroform-Paraffin tagelang bleiben, ohne brüchig zu werden, doch darf die Paraffinbehandlung nur sehr kurze Zeit (15—30 Minuten) dauern. Corning bringt die Embryonen aus dem Chloroform in Paraffin 45 °, dann in ein Gemisch von Paraffin 52 ° und Paraffin 56 ° auf 20 Minuten,

nach Corning

nach Morgan

Morgan die Eier vom Frosch in

1. Terpentin 2—5 Stunden,
2. Paraffin 42 °,
3. Paraffin 55—58 ° auf je $^{1}/_{2}$ Stunde und schneidet sie bei 24—26 °.

nach Röthig (Frosch, Kröte)

Ich selber habe mit folgendem Verfahren gute Resultate bei 15 μ Schnittdicke erzielt. Aus dem Chloroform, in welchem die Eier lange ohne Schaden liegen können, kommen sie in

1. Chloroform-Paraffin (42 °) āā auf dem Paraffinofen 1 Stunde, im Paraffinofen $^{1}/_{2}$ Stunde,
2. Paraffin 42 ° (einmal wechseln) 1 Stunde,
3. Paraffin 42 ° 1 T., Paraffin 56 ° 2 T. 1 Stunde, wobei letztere Mischung einmal gewechselt wird.

nach Röthig (Alytes)

Eier von Alytes, die lange in Alkohol gelegen hatten, bettete ich mit gutem Erfolg folgendermafsen ein; sie kamen in

1. 95 proz. Alkohol auf 10 Minuten,
2. 95 proz. Alkohol $^{1}/_{3}$, Schwefelkohlenstoff $^{2}/_{3}$ für 15 Min.
3. abs. Alkohol-Schwefelkohlenstoff āā, nachdem sie untergesunken waren, 10 Minuten,
4. Schwefelkohlenstoff für 12 Stunden.

Nun sättigt man den Schwefelkohlenstoff, der die Objekte enthält, erst in der Kälte, dann in der Wärme bei 1. 32—40 ° und bei 2. 58 ° mit Paraffin (42 °). Darauf kommen dann die Objekte für 10 Minuten in Paraffin (42 °) und ebensolange in die Mischung (Paraffin 42 ° $^{1}/_{3}$, Paraffin 58 ° $^{2}/_{3}$); hierin werden sie eingebettet.

Oviducte

Oviducte, welche Eier enthalten, entwässert Lebrun nach Fixation im Gilson'schen Sublimatgemisch nur so lange im abs. Alkohol, bis sie matt weiss geworden sind; dann kommen sie in Alkohol abs.-Chloroform āā und bleiben, nachdem sie zu Boden gesunken sind, noch 4 Minuten in diesem Gemisch. Dann in Chloroform auf 1 Stunde und in Paraffin.

Stücke vom Ovarium kommen nach Carnoy und Lebrun entweder überhaupt nicht in absoluten Alkohol (kleinere Eier) oder wenn nötig (grosse Eier des Salamanders) nur auf 5 Minuten. Auch der Aufenthalt im 95 proz. Alkohol soll nur kurz sein (1/4 Stunde), aus diesem oder dem abs. Alkohol in Chloroform-Alkohol abs. āā auf 1/2 Minute, von dem Augenblick an gerechnet, wo die Stücke am Boden liegen; dann in reines Chloroform auf 3—15 Minuten. In Chloroform-Paraffin bei 35—36° für 2 1/2—3 Stunden, nachdem sich das Paraffin gelöst hat, in reines Paraffin (52°) auf 2 1/2 bis 2 Minuten.

Ovarium

Aves

7. Aves

Bei der Einbettung der Vogelkeimscheiben und Embryonen wende ich folgende Zeiten an:

nach Röthig (Keimscheiben)

I. Keimscheiben, isoliert oder im Zusammenhang mit dem Dotter:

Chloroform-Paraffin (42°) āā im Ofen 3/4—1 Stunde,
Paraffin (42°) 1/2 Stunde,
Paraffin (42°) 1/3, Paraffin (56°) 2/3, 1/2 Stunde,
Paraffin (56°) 1/2 Stunde.

nach Röthig (Embryonen)

II. Ältere Embryonen.

Chloroform-Paraffin (42°) āā auf dem Paraffinofen die Nacht über, im Paraffinofen bei 58—60° 1/2 Stunde,
Paraffin (42°) 1/2—1 Stunde,
Paraffin (42°) 1/3, Paraffin (56°) 2/3, 1/2—1 Stunde,
Paraffin (56°) 1/2—1 Stunde,
Paraffin (56°) 1/2 Stunde.

Literatur

P. Mayer, Grundzüge der mikroskop. Technik, Berlin, 1901. — Mitteil. d. zool. Stat. Neapel Bd. 2. — Giesbrecht, Zool. Anzeig. Bd. 4, 1881. — Carnoy und Lebrun, La cellule T. 12, 1897. — Gathy, La cellule T. 17, 1900. — Born, Arch. mikroskop. Anat. Bd. 43, 1894. — O. Schultze, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 45, 1887; Arch. mikroskop. Anat. Bd. 55, 1900. — Fick, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 56, 1893. — Mercier, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 11. — Lee, Zool. Anzeig. Bd. 8, 1885. — Apáthy, Mikrotechnik, I. Abt. 1896, S. 149. — Hoffmann, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 17. — Henking, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 8. — Holl, Zool. Anzeiger Bd. 8, 1885. — Heidenhain, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 18. — Pranter, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 19.

Lee, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 12. — Erlanger, ibid. Bd. 14. — Rhumbler, ibid. Bd. 12 u. 13. — Kingsley, Americ. Naturalist. vol. 21, 1887. — Samter. Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 11/13. — Selenka, Zool. Anzeig. Bd. 8, 1885. — Andrews, Amer. Naturalist. vol. 21, 1887. — Kerr, Quat. Journ. Microsc. Sc. vol. 45. — Noak, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 15. — Jordan, ibid. Bd. 16. — Semon, Jen. Zeitschr. Naturwiss. Bd. 22, 1888; O. Hertwig, Entwickl. mittler. Keimbl. 1883, p. 55. -- Field u. Martin, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 11, 1894. — v. Davidoff, Mitteil. zoolog. Stat. Neapel Bd. 9, 1889—91. — Patten, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 11. — Woodworth, cit. nach Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 11. — Hoffmann, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 15/17.

Bütschli, Biolog. Centralbl. Bd. 1. — Blochmann, Zeitschr. f. wiss. Mikroskop. Bd. 1. — Loisel, Journ. de l'Anat. et de la Physiol. T. 36, 1900.

Kultschitzky, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 4. — Ryder, cit. nach Field und Martin, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 11, p. 7. — Koncewicz, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 11. — Jde, La cellule, T. 8. — Gilson, La cellule T. 6. — Field u. Martin, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 11. — Jordan, Zeitschr, wiss. Mikroskop. Bd. 17.

Boveri, Verhandl. physik. mediz. Gesellsch. Würzb. Bd. 29. — Reinke, Sitz.-Ber. Akad. Wiss. Berlin 1895. — van der Stricht, Arch. de Biolog. T. 15. — Lee, Recueil zool. suisse T. 4. — Coe, Zool. Jahrb., Abtlg. Anat. Bd. 12. — Nussbaum, Arch. mikroskop. Anat. Bd. 59. — Bonnevie, Jen. Zeitschr. Naturwiss. Bd. 36. — Fürst, Arch. mikroskop. Anat. Bd. 52. — Kostanecki-Siedlecki, Arch. mikroskop. Anat. Bd. 48.[1] — Lukjanow, Arch. mikroskop. Anat. Bd. 31 u. 34. — Kaiser, Biblioth. zool. H. 7, 1891. — Wheeler, Arch. de Biolog. T. 15. — Gathy, La cellule T. 17. — Stuhlmann, Ber. naturf. Gesellsch. Freiburg i. B. 1886, Bd. 1. -- Cholodkowsky, Mém. de l'Akad. de St. Pétersbourg 7 sér., T. 38. — Henking, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 8. — Meisenheimer, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 62. — Rössler, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 41. — Rottmann, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 70. — Samassa, Arch. Entwicklungsmech. Bd. 7. — Burchardt, Jen. Zeitschr. Naturw. Bd. 34. — Sobotta, Arch. mikroskop. Anat. Bd. 50. — Born, Arch. mikrosk. Anat. Bd. 43. — O. Schultze, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 45, Arch. mikroskop. Anat. Bd. 55. — Fick, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 56, — Ziegler, Anat. Hefte 19. — Adler, Internat. Monatsschr. Anat. Physiol. Bd. 18. — Lebrun, La cellule T. 7. — Carnoy-Lebrun, La cellule T. 12. — Corning, Morphol. Jahrb. Bd. 27, 1899. — Morgan, cit. nach Lee und Mayer, „Grundzüge“ 1901, p. 305/6.

[1] Cit. nach V. Häcker, Praxis u. Theorie etc., Jena 1899.

Kapitel 3

Übersicht über einige für die embryologische Technik wichtige Apparate

Der in den Abbildungen (Fig. 7 A—D) wiedergegebene Apparat dient dazu, die Behandlung embryologischer Objekte so schonend wie möglich zu machen; er ist nach dem System der Fairchild-schen Eimerchen und der Schaffer'schen Platinkörbchen gebaut.

Die nebenstehende Skizze Fig. 7 A gibt die Ansicht des Gesamtapparates wieder, die Zeichnungen B, C und D (auf Seite 56) seine einzelnen Teile. Im Innern des Standgefässes (B) hängt ein Einsatz (C), der keinen festen Boden hat und dessen Wände mit zahlreichen Durchbohrungen versehen sind. Der obere Rand dieses Einsatzes ist umgebogen und ruht auf einem nach innen gerichteten ringförmigen Vorsprung des Standglases (B a). Die untere Öffnung wird durch Gaze verschlossen (ich benutze dazu Stücke einer Mullbinde), die mit Hilfe eines Fadens festgebunden wird. Der Faden ruht in einer an der Aussenwand des Einsatzes etwas über seinem unteren Ende angebrachten Rinne (C, D b). Will man ein Gewebsstück, eine Keimscheibe, ein kleines Ei oder dergleichen fixieren, so bringt man dieselben in dem Einsatz auf die Gaze und hängt beides in das mit der Fixierungsflüssigkeit gefüllte Standgefäss. Durch die Gaze und die seitlichen Öffnungen im Einsatz dringt diese leicht ein und umspült

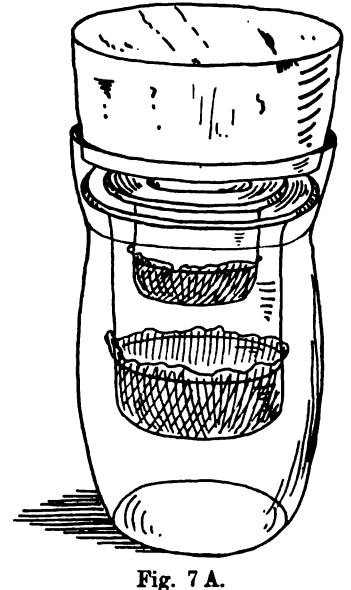


Fig. 7 A.

das Objekt von allen Seiten. Soll bei der Weiterbehandlung das Objekt gewaschen werden, so verschliesst man den Einsatz mit einem Korken; vermöge desselben schwimmt er im Wasser umher, wie die Fairchild'schen Eimerchen. So wird das Objekt ausgewaschen, ohne dass man befürchten muss, dass es fortgeschwemmt wird. Sodann kann man das Standgefäss nacheinander mit den verschie-

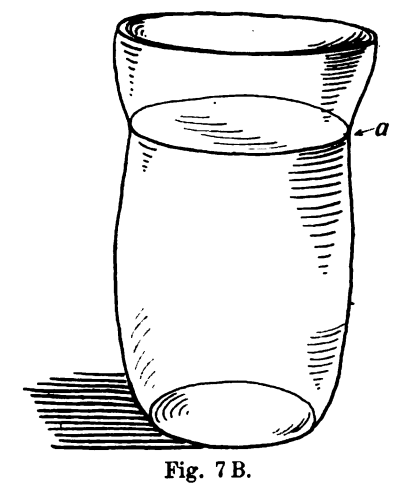


Fig. 7 B.

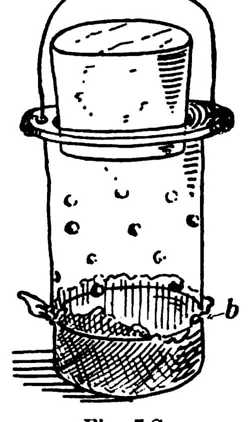


Fig. 7 C.

denen Alkoholen und mit Chloroform und Chloroform-Paraffin füllen und den Einsatz in die einzelnen Medien hineinhängen, wie auch Fairchild in seinen Eimerchen die Objekte die Alkoholreihe hat passieren lassen. Durch den Aufenthalt im Alkohol und im Chloroform-Paraffin wird die Gaze steif und hat, wenn man den sie am Einsatz befestigenden Faden durchtrennt, die Form einer Schüssel, in der das Objekt liegt. Nun überträgt man diese Schüssel in die Paraffingemische und in reines Paraffin und braucht schliesslich das Objekt selbst erst dann wieder zu berühren, wenn man es definitiv einbetten will. Für kleine und zarte Objekte, wie sie in der Embryologie zu behandeln sind, ist dieses Verfahren sehr bequem und zweckmäfsig. Die Fixierungsflüssigkeit umgibt und durchdringt das Objekt von allen Seiten und ebenso der Alkohol, und gerade um dieses zu er-

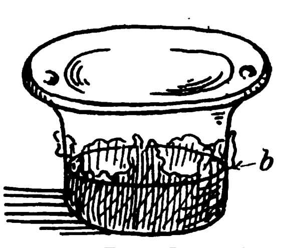


Fig. 7 D.

reichen, hat auch Schaffer seine Platinkörbchen gebaut. Der kleine Einsatz (D) ist angefertigt worden, um in demselben Standgefäss mehr als ein Objekt fixieren und behandeln zu können. Natürlich steht nichts im Wege, das Standgefäss beliebig gross zu wählen und noch mehr Einsätze in dasselbe hineinzubringen. Um schliesslich überhaupt ein Standgefäss vermeiden zu können, ist der umgebogene Rand der Einsätze an zwei gegenüberliegenden Stellen durchbohrt; durch die Löcher wird ein Faden gezogen, und man kann so die Einsätze auch in jedes andere Gefäss hineinhängen [1]).

Papierzellen

„Paper Cells" (Busk). Objekte, die man in toto in Kanadabalsam einschliessen will, kommen in zu diesem Zweck angefertigte Kammern aus Glas. Man kann sich solche aber auch aus Pappe

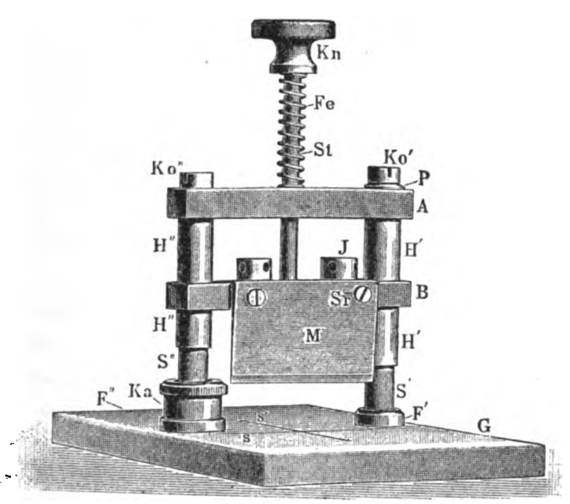


Fig. 8.

oder Karton herstellen, indem man aus dem Papier viereckige Rahmen ausschneidet und sie mit der gewöhnlichen Lösung von Kanadabalsam in Benzol, dem etwas Terpentinöl zugesetzt ist, durchtränkt. Dann trocknet man sie. Hierdurch wird die Durchlässigkeit des Papiers beseitigt. In die Öffnung des Rahmens kommt das Objekt, darüber das Deckglas.

Membranzerteiler

Membranzerteiler (H. Virchow). Dieser in Abbildung (Fig. 8) dargestellte Apparat ermöglicht es, durch flächenhafte

[1]) Der kleine Apparat ist durch J. Klönne u. G. Müller, Berlin, Luisenstr. 49 zu beziehen.

Präparate, wie Keimscheiben etc. gerade Schnitte in genau bestimmten Richtungen zu legen. Dies wird auf folgende Weise erreicht:

„Der Apparat besteht aus 4 Teilen: Messer, Glasplatte, Messerhalter und Rahmen.

„1. Messer. Das Messer (M) hat die Gestalt einer Platte von 30 mm Länge und 20 mm Höhe. Es trägt die Schneide unten und ist oben durch zwei Schrauben (Sr) an dem Messerhalter befestigt. Die Löcher für die Schrauben am Messer sind aber nicht rund, sondern schlitzförmig, in senkrechter Richtung verlängert, sodass nach dem Lockern der Schrauben das Messer etwas auf- und abwärts verschoben werden kann. Denn die Stellung des Messers muss so fein justiert werden können, dass beim Niederschlagen die Schneide gerade die Glasplatte erreicht, ohne auf diese aufzustossen, damit das Objekt durchschnitten wird, ohne dass die Schneide leidet.

„Diese Justierung wird erreicht durch zwei weitere Schrauben (J), welche in den Querbalken B eingeschraubt sind und auf den Messerrücken drücken; werden sie angezogen, so wird das Messer tiefer gestellt, nachdem zuvor die Schrauben Sr gelockert sind.

„2. Die Platte (G) besteht aus einem rechteckigen Stück Spiegelglas von 9 cm Länge und 6 cm Breite. Sie trägt drei ganz feine eingeritzte Linien, welche die Orientierung des Präparates begünstigen; die eine (s) unter der Schneide des Messers, die zweite (in die Figur nicht aufgenommen) parallel dazu in einem Abstand von 0,25 mm, die dritte (s') rechtwinkelig zu den beiden ersten. Auf diese Linien wird das Objekt geeignet gelegt, um dann durch einen Messerschlag seinen Richtungs- bezw. Zerteilungsschnitt zu bekommen. Die Orientierung des Objektes auf der Platte wird je nach Bedarf mit freiem Auge, Lupe oder Mikroskop gemacht. Da dies sich aber nur erreichen lässt, wenn man senkrecht auf das Präparat blicken kann, so muss es möglich sein, das Messer auf die Seite zu schlagen; und dies erfordert, da die Präzision der Messerführung und Arretierung nicht in Frage gestellt werden darf, eine besonders feine Ausführung.

„Messerhalter und Rahmen sind für den Beschauer der Figur auf den ersten Blick nicht auseinander zu finden; zum Messerhalter

gehört der untere Querbalken B, die beiden Hülsen H′ und H″ und die Stange St, welche mit B fest verbunden ist, durch ein Loch des oberen Querbalkens A passiert und am oberen Ende einen Knopf Kn trägt; zum Rahmen gehören die beiden Säulen S′ und S″ sowie der obere Querbalken A.

„3. Messerhalter. Die genannten Stücke B, H′, H″, St sind unter einander und mit dem Messer fest verbunden, sodass sie eine mechanische Einheit darstellen. Drückt oder schlägt man auf den Knopf Kn, so wird der Balken B und damit das Messer, geführt durch die Hülsen H′ und H″, gesenkt, bis die Hülsen auf den Sockel F′ und die Kappe Ka aufstossen. Beide Hülsen sind so abgeschnitteu, dass dieses Aufstossen in dem Moment geschieht, wo das Messer eben die Glasplatte berührt. Die Feder Fe hebt, indem sie sich auf den oberen Balken stützt, durch Druck gegen den Kopf die Stange und damit das Messer wieder empor, sobald der Fingerdruck aufgehört hat.

„4. Rahmen. Von den beiden Säulen des Rahmens ist die eine (S′) mit der Glasplatte fest verbunden. Zu dieser Säule gehört der Sockel F′ nnd der angeschraubte Kopf Ko′. Der Sockel hat, wie schon erwähnt worden ist, die Aufgabe zur Arretierung der Hülse H′ zu dienen, während die Hülse H″ durch die Kappe Ka aufgehalten wird. Der Kopf Ko′ ist in die Säule eingeschraubt. Die Säule passiert durch ein Loch in dem Balken A und dieser ist um die Säule frei drehbar. Damit aber der Balken A trotz dieser Beweglichkeit nicht wackelig gegen die Säule sei, womit die sichere Messereinstellung unmöglich werden würde, liegt eine Feder zwischen dem Balken und dem Kopfe Ko′, welche an dem Kopf eine Stütze findet und dadurch den Balken fest nach unten gegen die hier breiter werdende Säule drückt. Diese Feder (P) ist dargestellt durch eine Messingplatte, welche konkav gestanzt ist, und dadurch die Spannung erhalten hat, um als kräftige Feder zu wirken. Sie hat ein Loch, in welchem das oberste Ende der Säule steckt, um hier den Kopf Ko′ aufzunehmen.

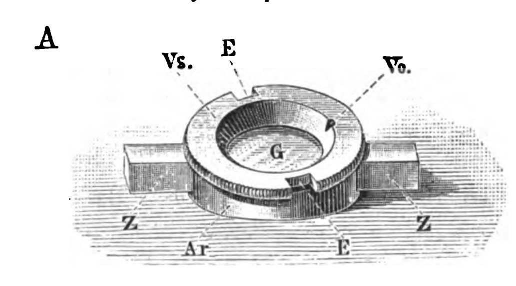
„Die andere Säule (S″) dagegen ist umgekehrt mit dem oberen Balken fest verbunden mittels der Kopfschraube Ko″, sie kann aber ihren Platz über der Glasplatte verlassen. Dieser Teil des Apparates ist an der Figur nicht ersichtlich; es würde hierzu noch eine zweite Figur nötig sein, an welcher die Kappe Ka,

welche das Fussstück von S'' deckt, emporgehoben dargestellt wäre. S'', Ka und F'' sind nämlich unter einander nicht fest verbunden, wie es beim ersten Blick auf die Figur scheinen könnte, sondern drei selbständige Stücke. Der Sockel F'', an der Glasplatte fest, trägt am oberen Ende einen keilförmigen Schwalbenschwanz; die Säule besitzt am unteren Ende einen entsprechenden schwalbenschwanzförmigen Ausschnitt, welcher knapp auf den Schwalbenschwanz des Sockels passt; die Kappe dient dazu, Säule und Sockel fest zu verbinden, wenn das Messer benutzt werden soll. Ist dagegen die Kappe gehoben, so lässt sich durch einen horizontalen Druck die Säule vom Sockel herunterschieben, und der aus A und S'' bestehende Teil des Rahmens zusammen, mit Messerhalter und Messer, schlägt dann um die feststehende Säule S' zur Seite.

„Das Schneiden geschieht durch einen kurzen Schlag . . . . .
„Der Apparat ist durch Herrn Richard Magen hergestellt".

Embryoskop nach L. Gerlach

Das Embryoskop von L. Gerlach



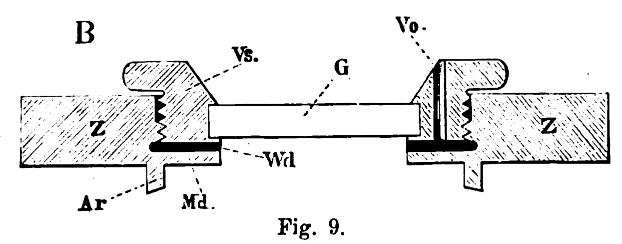


Fig. 9.

Dieser Apparat ist früher hergestellt worden von Reiniger, Gebbert und Schall in Erlangen, wird aber jetzt nach den mir von der genannten Firma gewordenen Mitteilungen nur noch von dem Herrn Institutsmechaniker Richard Hennig am physiol. Institut in Erlangen angefertigt. Die ganze Zusammenstellung des

Apparates ergibt Abbildung (Fig. 10), eine Totalansicht Abbildung (Fig. 9 A), einen Durchschnitt Abbildung (Fig. 9 B). Seine einzelnen Teile sind:

1. ein Aufsatzring,
2. das Verschlussstück,
3. ein Trepan und ein dazu passender Führungsring,
4. ein Schlüssel zum Aufschrauben des Verschlussstückes.

Die Einzelheiten in der Anwendung des Embryoskopes ergeben sich aus folgenden Worten Gerlachs:

„Der Aufsatzring ist eine niedrige cylindrische Metallhülse, deren Wand eine Dicke von $1^1/_4$ mm, deren Lumen einen Durchmesser von 2 cm besitzt. Der untere Rand ist mit einer sattelförmigen, der äquatorialen Eioberfläche möglichst angepassten Schweifung versehen, während der obere Rand eben ist. Von der äusseren Fläche der Hülse gehen diametral gegenübergestellt zwei längliche rechteckige Metallzapfen (Z) ab. An der Innenfläche ist nicht weit oberhalb des unteren Randes ein Diaphragma (Md) angebracht, dessen rundliche Öffnung einen Durchmesser von 13 mm zeigt. Nach der Grösse dieser Öffnung richtet sich der Umfang der in die Schale einzuschneidenden Fensterapertur. Unmittelbar oberhalb des Diaphragma ist in die innere Wand der Metallhülse eine sehr feine cirkuläre Rinne eingedreht, in welche ein zweites, aus dünnem Wachstuch bestehendes Diaphragma (Wd) mit seinem Rande eingelassen werden kann. Dasselbe stimmt mit dem erst genannten metallenen Diaphragma in Grösse und Form völlig überein. Beim Gebrauche des Instrumentes hat man es in den Aufsatzring so hineinzubringen, dass es dem metallenen Diaphragma überall fest aufliegt,



Fig. 10.

da es, wenn das Verschlussstück eingeschraubt wird, die Dichtung für den festen Aufschluss abgibt. Oberhalb der cirkulären Rinne befinden sich an der inneren Wand der Hülse einige Schraubenwindungen, welche dem Verschlussstück als Schraubenmutter dienen; jedoch reichen dieselben nicht ganz bis zum oberen Rand heran, vielmehr ist hier ein etwa $1^1/_2$ mm breiter Streifen der inneren Wand völlig glatt.

Das Verschlussstück des Embryoskopes ist ein niedriger Vollcylinder, dessen periphere ringförmige Zone aus einem Metallring, dessen zentraler Teil aus einer runden, ziemlich dicken Glasscheibe (G) besteht. Dieses stellt das Fenster dar, welches die in die Schale einzuschneidende runde Öffnung zu überdecken hat; sie hat jedoch nicht die gleiche Höhe wie ihre Metallumfassung, sondern ragt nur mit ihrer unteren Ebene nahezu ebenso weit nach abwärts wie deren unterer etwa $3^1/_2$ mm breiter plangeschliffener Rand. Letzterer wird beim Einschrauben des Verschlussstückes in den Aufsatzring auf das Wachstuchdiaphragma fest angepresst, wodurch der dichte Abschluss zu stande kommt. Der äussere Umfang des ringförmigen Verschlussstückes ist mit entsprechenden Schraubenwindungen versehen, mit Ausnahme seines obersten Teiles, in welchem der Metallring sich peripherwärts verbreitert, um mit einem vertikal stehenden gerieftem Rand aufzuhören. Dieser Rand zeigt zwei diametral gegenüber gestellte eckige Einschnitte (E), in welche die Zinken eines kleinen Schlüssels hineinpassen . . . . Ausserdem besitzt der Metallring des Verschlussstückes einen engen kurzen vertikal verlaufenden Rohrkanal (Vo), dessen unteres Ende in der Mitte des unteren ausmünden muss. Ich will diesen Kanal kurz als Ventilöffnung bezeichnen. . . . . . . Bezüglich des Trepans sei bemerkt, dass derselbe eine $2-2^1/_2$ cm lange, sehr dünnwandige Metallhülse darstellt, deren unterer Rand gezähnelt ist, deren oberes Ende einen breiteren, gerieften Rand trägt. Von der Weite des Trepans hängt natürlich die Grösse der zu bohrenden Öffnung der Eischale und Schalenhaut ab; doch hat der Trepan einen, wenn auch nur ganz unbedeutend, kleineren Durchmesser als die Höhlung des im Aufsatzring befindlichen Diaphragmas. Dies hat den Zweck, dass beim Ausbohren der Fensteröffnung nach innen vom inneren Rande des Diaphragmas eine äusserst feine, mit Schellack überstrichene Zone der Schale stehen bleibt; durch einen etwas grösseren Trepan würde

leicht der Schellacküberzug teilweise lädiert und damit sein Nutzen illusorisch gemacht werden.

„Der Führungsring für den Trepan hat ganz die gleiche Beschaffenheit wie das Verschlussstück des Embryoskopes, nur mit dem Unterschiede, dass in ihn kein Glasscheibchen eingesetzt ist, sodass in der Öffnung des Ringes, die natürlich dem Umfang des Trepans angepasst sein muss, der letztere unbehindert rotieren kann.

„Die Metallgabel besteht aus einem eisernen Griff, der in zwei Branchen gabelig ausläuft; an deren Enden sind zwei eckige Vertiefungen angebracht, welche so geformt sind, dass sie die beiden am Aufsatzringe des Embryoskopes befindlichen Zapfen aufnehmen können. Ist daher ein Ei mit einem Embryoskope armiert, so lässt es sich durch Vermittlung des letzteren der Metallgabel fest auflegen und es kann mit derselben gehalten werden, wenn man mit Hilfe des Schlüssels das Verschlussstück in den Aufsatzring fest einschrauben oder wenn man es durch Aufschrauben wieder entfernen will.

„Der Schlüssel endlich, der nur dazu dient, um mit grösserer Hebelkraft arbeiten zu können, ist ähnlich beschaffen, wie ein Reisszeugschlüssel; er ist mit zwei Zinken versehen, welche in die am oberen Rande des Verschlussstückes befindlichen Einschnitte einzugreifen haben.

„Im folgenden möchte ich nun eine Gebrauchsanweisung des Embryoskopes angeben. Zur Armierung eines Eies mit demselben sind zwei zeitlich getrennte Manipulationen nötig:

1. Aufkitten des Aufsatzringes.
2. Trepanation der Eischale und Schalenhaut und Verschluss der Öffnung durch Aufschrauben des Verschlussstückes.

„Das Aufkitten des Aufsatzringes erfolgt immer in derselben Weise, gleichviel ob das Ei noch unbebrütet ist, oder schon 2 bis 3 Tage im Brütofen gelegen hat. Als Kittes bediene ich mich eines Gemenges von 2 Teilen Wachs und 3 Teilen Kolophonium, das bei Zimmertemperatur eine starre, brüchige Beschaffenheit hat, dagegen kurze Zeit in der warmen Hand gehalten, weich und knetbar wird. Dasselbe tritt nach kurzem Verweilen im Brütofen ein. Von diesem Kitt pflege ich mir längliche Wülstchen zu kneten; ist dies geschehen, so wird der Aufsatzring einen Augenblick lang über einer

Gas- oder Spiritusflamme erwärmt und hierauf die untere Fläche seines Diaphragmas mit dem einen Ende eines solchen Wülstchens bestrichen; die Kittmasse wird bei ihrer Berührung mit dem erwärmten Metall flüssig, was eine festere Adhärenz bewirkt. Sodann wird das Wülstchen in die Furche zwischen der unteren Fläche des Diaphragmas und dem unteren Rande des Aufsatzringes so eingelegt und angedrückt, dass es, die Furche völlig ausfüllend, ebenfalls einen geschlossenen Ring bildet. Dieser Ring der Kittmasse behält infolge der vorausgegangenen Erwärmung des Aufsatzringes seine weiche Konsistenz eine Zeitlang bei; sobald letzterer genügend abgekühlt ist, wird er auf die äquatoriale Oberfläche eines Hühnereies so fest als möglich aufgedrückt, wobei die noch weiche Kittmasse, welche Eischale und Aufsatzring mit einander verbinden muss, nach innen und aussen hervorquillt. Beim Andrücken des Aufsatzringes ist die Vorsichtsmafsregel zu beobachten, dass dieser seitwärts und nicht nach oben gewendet wird, damit er nicht direkt über die Keimhaut zu liegen kommt und diese, falls er noch nicht genügend abgekühlt sein sollte, schädigt. Ehe die hervorgequollene Kittmasse wieder spröde wird, ist sie sowohl an dem Innenrande des Metalldiaphragmas als an dem unteren Rande des Aufsatzringes mittelst eines kleinen spitzen Messerchens abzustreifen. Nachdem dies geschehen, so wird man, falls der Aufsatzring an geeigneter Stelle der Eischale angelegt und genügend angedrückt worden war, erkennen, dass zwischen beiden nur ein sehr geringer mit Kittmasse erfüllter Zwischenraum geblieben ist. Ein solches schmales Interstitium liegt sowohl am inneren Rande des Diaphragmas als am unteren Rande des Aufsatzringes. An beiden Stellen ist auf dasselbe zum Schluss mit Hilfe eines feinen Pinsels alkoholische Schellacklösung (gelber Schellack) aufzutragen. Dies muss sorgfältig ausgeführt werden, indem hierbei die Kittmasse vollständig gedeckt werden muss, die Eischale jedoch nach aussen und innen von beiden Rändern nur so wenig als möglich überstrichen werden darf.

„Bei einem unbebrüteten Ei ist der Schellack nach 12 bis 14 Stunden bei einem schon angebrüteten, das in den Brütofen zurückkommt, bereits nach 6 Stunden trocken geworden.

„Nach Ablauf dieser Zeit kann die Eröffnung des Eies stattfinden; dieses sowohl als auch das Einfügen des Verschlussstückes muss unter antiseptischen Kautelen erfolgen. . . . . . Ein längliches

Porzellan- oder Glasschälchen (Vogelnapfschälchen) wird mit 3proz. Karbollösung gefüllt, und in dieses werden ein stärkerer Pinsel, eine kleinere Schere, eine Pinzette, ein Glasstab, der Trepan und der Führungsring eingelegt. Diese Instrumente werden vor dem jedesmaligen Gebrauche mit Karbolwatte abgetrocknet und kommen nachher in das Schälchen wieder zurück. Nachdem man sich die Hände in verdünntem Sublimat oder Karbollösung gewaschen, bestreicht man ein möglichst frisches Ei mittels des Pinsels mit der 3proz. Karbollösung und trocknet es mit Karbolwatte ab; sodann wird mit der Schere der spitze Eipol abgetragen und an dem Glasstabe aus dieser Öffnung das mehr dickliche Eiweiss in ein sauber gereinigtes Glasschälchen abgegossen, sodass in der Schale nur Dotter und das dünnflüssige Eiweiss zurückbleibt. Dieses findet beim Einschrauben des Schlussstückes Verwendung und muss daher immer vorrätig gehalten werden.

„Nach diesen Vorbereitungen wird das mit einem aufgekitteten Aufsatzringe versehene Ei ebenfalls durch die Karbollösung sorgfältig gereinigt und alsdann auf einen Eiträger so aufgelegt, dass der Aufsatzring nach oben sieht. In die Höhlung des letzteren wird nun mit dem Pinsel die Karbollösung auf 1 bis 2 Minuten eingebracht, wonach diese abgeschüttet und durch $^1/_2$proz. Kochsalzlösung ersetzt wird. Auch die letztere wird nach weiteren 1—2 Minuten wieder ausgegossen und die Vertiefung mit Karbolwatte völlig trocken gelegt; nun wird der Führungsring eingeschraubt und es kommt der Trepan in Anwendung. Hierbei beachte ich ebenfalls wieder die Vorsicht, beim Trepanieren der Schale das Ei so zu halten, das die zu bohrende Öffnung seitwärts sieht. Man fühlt sofort, wenn der Trepan tiefer in das Ei eindringt, dass die Schale durchbohrt ist; worauf der Trepan herausgezogen und das Ei wieder mit der gebohrten Öffnung nach oben gestellt wird; auch der Führungsring wird sodann entfernt. Hat man noch mehrere Eier zu trepanieren, so ist es ratsam, den Trepan gleich wieder zu reinigen und ihn in die Karbollösung zurückzubringen."

„Sehr häufig wird beim Ausziehen des Trepans das ausgebohrte Schalenstück, zuweilen auch mitsamt dem dazu gehörigen Scheibchen der Schalenhaut entfernt. Ist dies nicht der Fall, so muss ersteres mit der Pinzette abgehoben werden, sodann müssen in gleicher Weise auch die kleineren Schalenhautstückchen mit der Pinzette

gefasst und herausgerissen werden, wobei natürlich acht zu geben ist, dass die Keimhaut und Zona pellucida nicht verletzt wird.

„Ist nach Herstellung der rundlichen Öffnung in der Schale und Schalenhaut die Keimhaut blossgelegt, so wird auf diese aus dem eiweisspendenden Ei an dem Glasstabe flüssiges Eiweiss bis zum oberen Rand des Aufsatzringes aufgeträufelt, wobei zu beachten ist, dass sämtliche Luftblasen, welche etwa bei Perforation der Schale ins Innere derselben gelangt und nach oben aufzusteigen bestrebt sind, durch Abstreichen mit der Pinzette beseitigt werden. Es folgt hierauf das Einbringen des Wachstuchdiaphragmas, welches vorher ebenfalls in Karbollösung eingetaucht, zwischen Fliesspapier getrocknet und durch das in den Schälchen befindliche dickere Eiweiss gezogen worden ist. Dieses Dichtungsdiaphragma muss, wie schon betont, dem Metalldiaphragma überall fest angedrückt werden, wobei meistens einige Luftblasen aufzusteigen pflegen. Um auch diese zu entfernen, pflege ich nochmals flüssiges Eiweiss nachzugiessen. Es wird nun das Verschlussstück, das ebenfalls vorher in der Karbollösung gelegen und mit Watte abgetrocknet war, vorsichtig, damit keine Luftblasen eindringen, aufgesetzt und langsam eingeschraubt. Hierbei fliesst aus der Ventilöffnung das überschüssige Eiweiss langsam heraus, bis das Verschlussstück mit seiner unteren Fläche die Dichtung erreicht, womit zugleich die Ventilöffnung verschlossen wird. Zum Schlusse wird, wenn die Kraft der Hand nicht mehr ausreicht zu drehen, das Ei mit seinem Embryoskope in die Metallgabel eingelegt und nun mit Hilfe des Schlüssels langsam und vorsichtig weiter geschraubt, bis es auch mit diesen Mitteln nicht mehr möglich ist. Bei gut gearbeiteten Embryoskopen ist der so hergestellte Verschluss ein absolut luftdichter."

In einfacherer Weise kommt man zum Ziel, wenn man (nach Gerlach) die Öffnung in der Schalenhaut mit einem kleinen (Damen-)Uhrgläschen, das die Ränder derselben überragt, verschliesst. Man stellt das Ei in einem Becher so auf, das der stumpfe Pol unten, der spitze oben ist; den letzteren umschneidet man, sodass eine Öffnung von der gewünschten Grösse entsteht. Darauf wird etwas Eiweiss abgegossen und der Dotter so gedreht, dass der Embryo in der Öffnung erscheint. Nun wird das Eiweiss wieder hineingegossen. Der Rand der Öffnung und des Uhrglases wird mit einer Lösung von Gummi arabicum bestrichen; nachdem das Uhr-

glas aufgelegt ist, pinselt man auf seinen Rand Kollodium; ist dies fest geworden, so kommt darauf eine Schicht von Bernsteinlack. Peebles bedeckt die gesetzte Öffnung mit einem Stück Eischale, an dem noch Schalenhaut festsitzt. Über die Ränder des Deckels werden Streifen von Schalenhaut gelegt, die bald fest antrocknen und das Ei verschliessen. Das Verfahren von Gerlach ist nur anwendbar zur Besichtigung der Embryonen bis zum 5. Bruttage; für ältere bis zum 10. Bruttage gebraucht man das Embryoskop von Preyer. Bedingung dabei ist, dass die Eischale ungefärbt ist. Dieser Apparat beruht in der Hauptsache darauf, „dass das Ei vom direkten Sonnenlicht oder einer sonstigen starken Lichtquelle durchleuchtet wird und die Lichtstrahlen, nachdem sie das Ei passiert haben, mit Hülfe eines passend gestellten Spiegels in das Auge des Beobachters reflektiert werden“.

Embryoskop nach Preyer

Durchströmungskompressorium von H. E. Ziegler. Dasselbe ist in zwei Formen hergestellt worden. 1. Durchströmungskompressorium erster Form; sein Durchschnitt ist in Abbildung (Fig. 11) abgebildet.

Durchströmungskompressorium

„Dasselbe besteht aus zwei Messingplatten, einer unteren, welche rund ist und einer oberen, welche dreieckig ist. Beide Platten sind in der Mitte mit einem runden Loch versehen; über der Öffnung

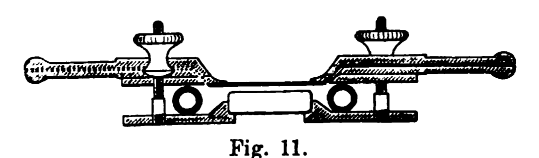


Fig. 11.

der unteren Platte ist ein rundes Stück Spiegelglas aufgekittet, welches als Objektträger dient; unter der Öffnung der oberen Platte befindet sich das Deckglas. Die beiden Platten werden durch einen hohlen Kautschukring auseinander gehalten, und die Stellung der oberen Platte wird durch drei Schrauben reguliert. An der oberen Platte sind zwei Röhrchen angebracht, von welchen das eine zur Zuleitung, das andere zur Ableitung des Wassers dient. Das Wasser, welches durch den Apparat fliesst, muss über die Spiegelglasplatte unter dem Deckglas hindurchgehen; es kann nicht neben der Spiegelglasplatte vorbeifliessen, denn der Kautschukring ist zwischen zwei Zapfen in der Weise eingesetzt, dass er eine bisquit-

förmige Gestalt hat und in der Mitte die Spiegelglasplatte beiderseits berührt."

2. Das Kompressorium zweiter Form unterscheidet sich dadurch von dem eben beschriebenen, dass es grösser ist und eine rechteckige Gestalt besitzt. Ferner ist „ein dicker und ein dünner Kautschukring vorhanden; der erstere dient für grosse Objekte, der andere für kleine; sind die Objekte sehr klein, so legt man innerhalb des dünnen Rings eine dem Apparat beigegebene ovale Glasplatte ein, welche die Dicke eines gewöhnlichen Objektträgers hat."

Beide Kompressorien sind ferner so eingerichtet, dass man ihnen (bei horizontal liegendem Mikroskop) eine Vertikalstellung geben kann. Über weitere Einzelheiten in der Anwendung siehe die Originalabhandlung von H. E. Ziegler (Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. Bd. 14). Beide Apparate werden hergestellt von der Firma Herm. Elbs, Freiburg i. B.

Prismenrotator

Prismen- und Kapillarrotator (C. Zeiss). Die in den Abbildungen 12 und 13 dargestellten Apparate „sollen ermöglichen, kleine Objekte, deren Bewegung unter dem Mikroskop mit freier Hand Schwierigkeiten bietet, nach einander von verschiedenen Seiten zu beobachten." Beide sind Nebenapparate zu dem Greenough-schen binokularen Mikroskop. Der Prismenrotator wird ausserdem in zwei Modellen geliefert; bei dem ursprünglichen, auch hier abgebildeten (Abbildung 12) ist durch eine ungerade Anzahl von

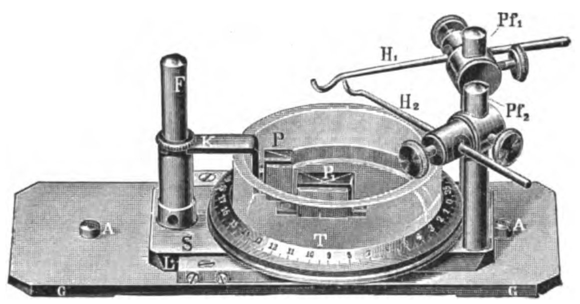


Fig. 12 a.

Spiegelungen in der Seitenansicht rechts und links vertauscht, bei einem neueren ist dieser Fehler eliminiert. Abbildung 12a gibt die Gesamtansicht, Abbildung 12b den Durchschnitt wieder. O ist das Objekt, das untersucht werden soll; dasselbe kommt auf die

Hypothenusenfläche des grossen Prismas P zu liegen. Durch Spiegelung an den Katheten S_1 und S_2 in der Richtung aS_1S_2A gewinnt der Beschauer ein Bild von der unteren Fläche von O, durch eine solche an der Hypothenusenfläche des kleinen Prismas p (S_3) eine Anschauung der seitlichen Fläche des Objekts. In beiden Fällen muss der Apparat seitlich verschoben werden, bis das erste Mal der Punkt S_2, das zweite Mal der Punkt S_3 in die Achse des Mikroskopes fällt.

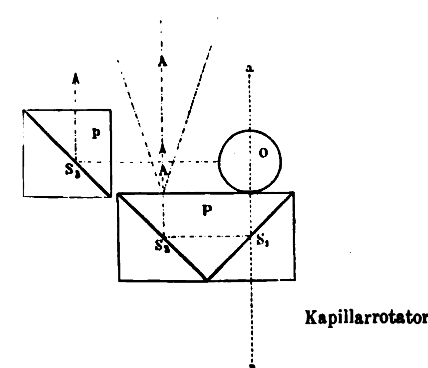


Fig. 12 b.

Kapillarrotator

Der Kapillarrotator (Abbild. 13) „dient zur Drehung kleiner Objekte, die innerhalb einer Kapillare eingeschlossen werden können, um eine horizontale Achse. Der Apparat ist so eingerichtet, dass die Glaskapillaren in einer mit Cedernholzöl gefüllten Kammer gedreht werden können, damit die Brechungen und Reflexionen an der Kapillarwand nicht störend wirken.“

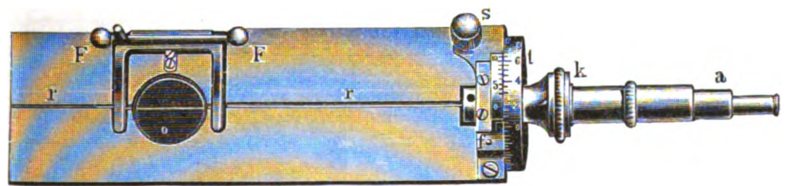


Fig. 13.

r ist die Längsrinne, in der sich die Kapillare bewegt, o die Kammer, die mit Cedernholzöl gefüllt wird, F eine Klammer, die dazu dient, die Bewegung desjenigen Teiles der Kapillare, der in o liegt und das Objekt enthält, ruhig zu gestalten. Die Einrichtung rechts am Apparat (S, K, a) bewegt die Kapillare und schützt ihr hervorstehendes Ende. In Betreff beider Apparate verweise ich auf die ausführliche Beschreibung von W. Gebhardt in Zeitschr. f. wiss. Mikroskop. Bd. 14, p. 309—312.

Photographierapparat (O. Hertwig)

Apparat zum Photographieren wagerecht liegender Objekte von der Ober- und Unterseite (C. Zeiss; vergl. O. Hertwig, Sitz.-Ber. d. Königl. Preuss. Akademie d. Wissensch. 1902, 22. April.) Dieser auf Anregung von O. Hertwig konstruierte

Apparat wird verbunden mit der grossen mikrophotographischen Kamera von C. Zeiss. Eine Anordnung zum Photographieren horizontal liegender Objekte von oben her zeigt Abbildung 14a, eine solche von unten her Abbildung 14b. Durch den Spiegel Sp (Abb. 14a) fällt Licht von der Linse (L) auf das Objekt (O). Durch das Objektiv (e) und das Prisma (p) wird das Bild von O auf die vertikal stehende photographische Platte projiziert. Der Tisch (T) besitzt eine 8 cm weite runde Öffnung; er kann in dem Gestell (S)

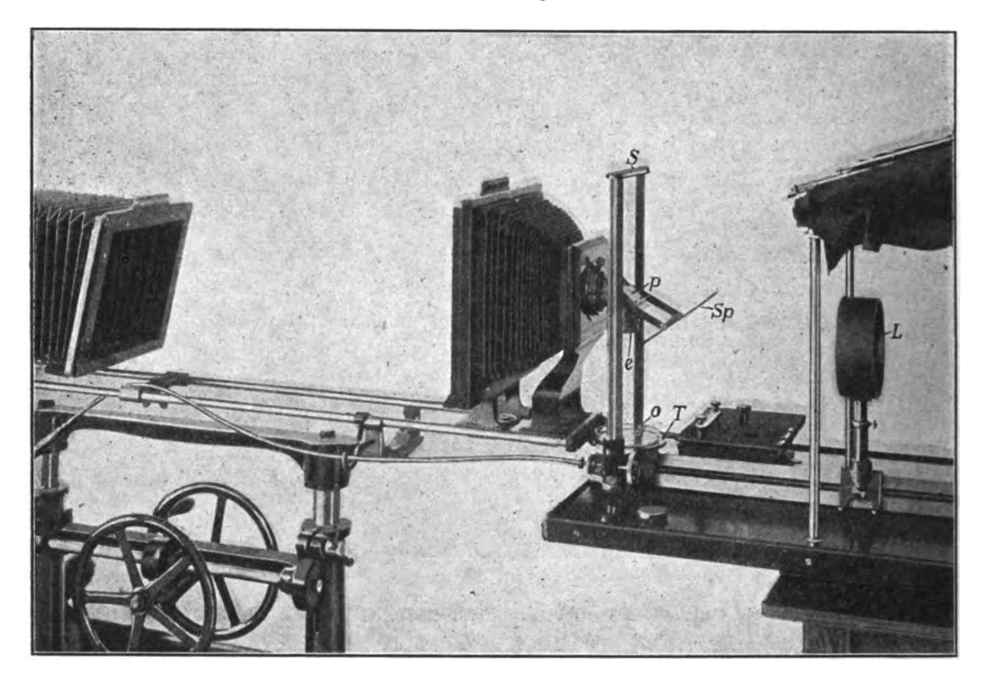


Fig. 14a.

mittels Zahntriebes aufwärts bewegt werden. Spiegel, Objektiv und Prisma hängen zusammen und können umgedreht werden, sodass bei einer Stellung des Tisches und Objektives oberhalb von e, p, Sp die Unterseite des Objektes beleuchtet und dann ihr Bild durch Objektiv und Prisma wieder auf die photographische Platte geworfen wird (Abb. 14b).

Zeichenapparat (C. Zeiss)

Zeichenapparat für schwache Vergrösserungen (C. Zeiss). Dieser in Abbildung 15 (Seite 72) abgebildete Apparat ist sehr

bequem und handlich, besonders bei Anwendung des Objektives a*, wie ich auf Grund vielfacher Beobachtung sagen kann; sein Prinzip ist aus der Abbildung ohne weiteres verständlich. Für manche Einzelheiten in der Anwendung verweise ich auf die Abhandlung von Max Berger, Zeitschr. f. Instrumentenkunde Bd. 21, p. 171 bis 175, 1901.

Chabry's Apparat, nach Kopsch

Chabry's Apparat in der Modifikation von Kopsch. Der Apparat, der von Herrn Richard Magen in Berlin angefertigt

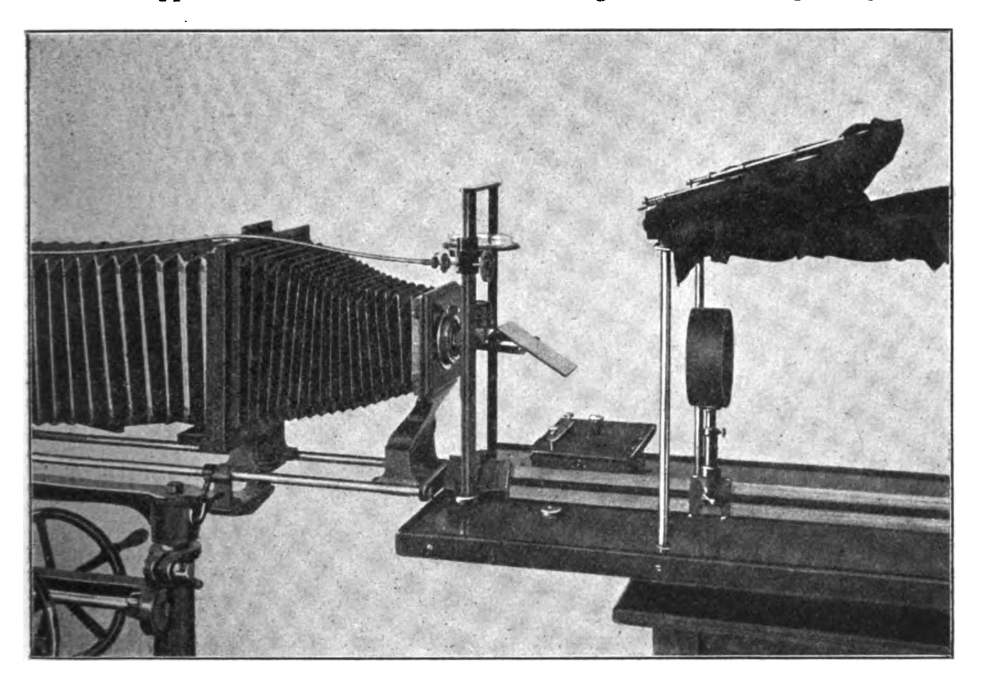


Fig. 14 b.

ist, erlaubt das An- oder Durchstechen eines in einer Glaskapillare befindlichen Eies resp. eines Teiles desselben mit Hilfe einer feinen Glasnadel. Durch eine Mikrometerschraube und eine sinnreiche Abzugsvorrichtung kann das Vorschnellen der Nadelspitze ganz genau reguliert werden. Eine detaillierte Beschreibung des Apparates und seiner Nebenteile und Handhabung findet man bei Kopsch[1]).

[1]) Internat. Monatschr. Anat. Physiol. Bd 17, 1900.

Belichtungs-apparat (Landolt-Röthig)

Belichtungsapparat nach Landolt-Röthig (Fig 16). Dieser Apparat ermöglicht es, bei einer Auerlampe als Lichtquelle und bei Verwendung bestimmter Lichtfilter für Rot, Gelb, Grün und Blau fast vollkommen monochromatisches Licht zu erzielen. Die Zusammensetzung der Filterflüssigkeiten ist in dem Abschnitt über experimentelle Entwickelungsgeschichte enthalten. Hier interessiert uns die Einrichtung des Apparates. Die Cüvetten (C)

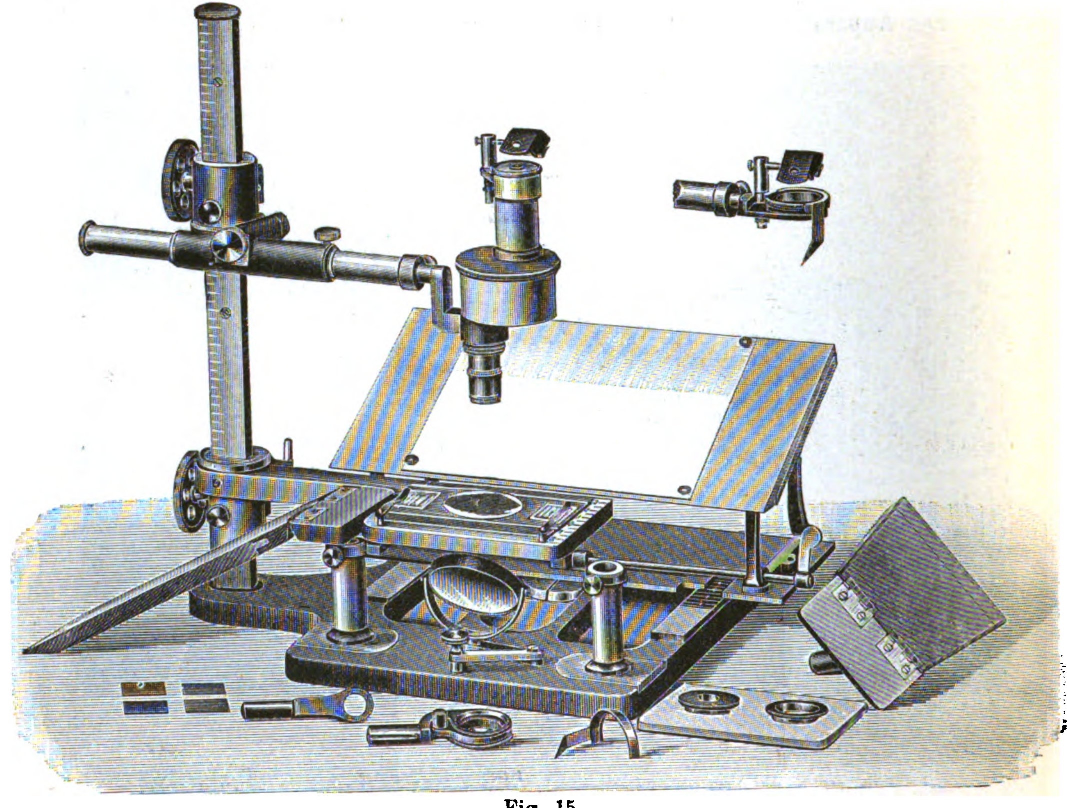


Fig. 15.

sind ringförmig und von planparallelen Platten begrenzt. Ihr Durchmesser beträgt 4 cm, der Abstand der planparallelen Platten von einander 15 oder 20 mm. Zusammengefasst werden die Cüvetten zu Cüvetten-Systemen mit Hilfe von dunklen Metallhülsen (M); das eine System besteht aus 2 Cüvetten von je 20 mm Plattenabstand, das andere aus 3, von denen die ersten beiden 15 mm, die dritte

20 mm Plattenabstand haben. Nachdem das Licht der Lampe das Cüvettensystem passiert hat, fällt es auf einen Spiegel und wird von ihm auf das in der Glasschale liegende Objekt geworfen. Der Spiegel ist um die Richtung des Lichtes als Achse drehbar, sodass die Objekte von oben, von unten, schräg von oben und schräg von unten belichtet werden können. Sollen sie von unten belichtet werden, so kommt die Schale auf den Ring. Der Spiegel

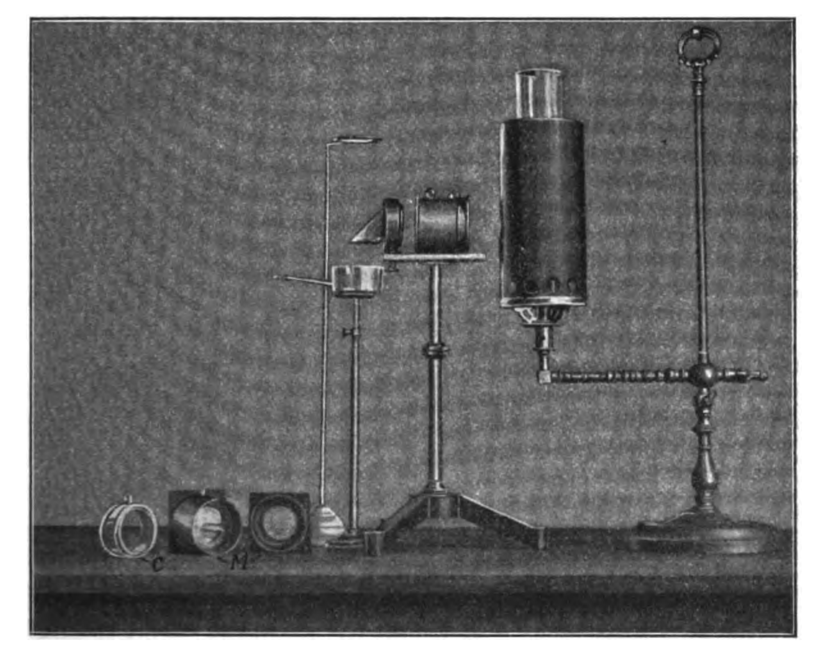


Fig. 16.

lässt sich ferner vom Tisch abnehmen, sodass die Lichtstrahlen nach ihrem Austritt aus dem Cüvettensystem spektroskopisch untersucht werden können. Der ganze Apparat befindet sich in einem geschwärzten Kasten, sodass nur dasjenige Licht zu den Objekten gelangen kann, das von der Lampe ausgeht und durch die Cüvetten hindurchgegangen ist. Der Apparat ist von Schmidt u. Haensch, Berlin, konstruiert.

Kapitel 4

Coelenterata Echinodermata

Coelenterata [1])

Spongiaria 1. Fortpflanzung

Spongiaria. Fortpflanzung. Die Sykonenlarven sind mikroskopisch klein; um sie lebend untersuchen, aufziehen und fixieren zu können, wandte O. Maas einige Kunstgriffe an. Er setzte die reifen Schwämme in weite niedrige Schalen, auf die das Tageslicht stets in einer bestimmten Richtuug einfiel. Wenn die Larven ausschwärmten. sammelten sie sich an der Oberfläche des Wassers in der Einfallsrichtung des Lichtes an und konnten gleichsam „abgerahmt“ werden. Das die Larven enthaltende Wasser brachte er tropfenweise in kleine aber stark gewölbte Uhrschälchen; reines Seewasser tat er soviel hinzu, dass ein aufgelegtes Deckglas ohne zu schwimmen an die Gefässwände sich anlegte. Die Verdunstung wurde dadurch verhindert, dass die Schalen in grösseren verschlossenen Gefässen aut Seewasser schwammen. Bei ihrer Entwickelung setzen sich die Larven am Deckglase fest; will man sie lebend beobachten, so setzt man Schälchen und Deckglas auf den Objekttisch des Mikroskops; will man fixieren, so bringt man das Deckgläschen mit den Larven in die gewählte Fixierungsflüssigkeit. Wie die Sykonenlarven an die Deckgläser, so setzen sich nach den Beobachtungen von Fiedler auch die Larven von Spongilla an die Blätter der Elodea canadensis und an sorgfältig ausgewaschene Kollodiumplättchen (Vosmaer) an und können mit beiden zusammen bequem transportiert und geschnitten werden.

2. Fixation

Fixation. Zur Fixierung der Nadeln eignet sich nur der absolute Alkohol; zur Erhaltung der zelligen Verhältnisse sind verwandt worden

[1]) Über die Methoden von Hammar zur Darstellung der Verbindungen zwischen den Blastomeren siehe Seite 79 unter 3 (Sublimat).

1. Chrom-Osmium-Essigsäure (Flemming),
2. kaltgesättigte Sublimatlösung 1, Aq. dest. 1, 70 proz. Alkohol 1,
3. Pikrin-Schwefelsäure nach Kleinenberg.

Wegen der Anfertigung von Totalpräparaten siehe die Methode von Minchin.[1])

Scyphomedusen

Scyphomedusen. Fixation. Um Larven ausgestreckt zu erhalten, setzt Friedemann dem die Tiere enthaltenden Seewasser einige Tropfen einer konzentrierten Chloralhydratlösung zu und lässt dieses Mittel 1—5 Stunden einwirken.

Fixation

Fixierungsmittel:

1. Sublimat in Seewasser gesättigt . 100
   Eisessig 2
2. Formol,
3. Chrom-Osmium-Essigsäure,
4. abs. Alkohol,
5. Pikrin-Salpetersäure.

Hydromedusen 1. Fortpflanzung

Hydromedusen. Fortpflanzung. Über die Fortpflanzung von Aequorea Forsk. macht V. Häcker die folgenden wichtigen Angaben: Die Tiere sind getrennt geschlechtlich; die Gonadenbänder sind beim Männchen blau, beim Weibchen rosa gefärbt (nach Claus). Die Tiere paaren und halten sich in der Gefangenschaft gut. Im Monat April erfolgt die Eiablage zwischen 7 und $7^1/_2$ Uhr morgens, die Abschürung des 1. Polkörperchens vor 9 Uhr, die 2. Richtungsteilung um $^1/_2$10 Uhr, die 1. Segmentierung zwischen 10 und 11 Uhr, die 2. Segmentierung um $11^3/_4$ Uhr; weiterhin tritt bis zum 64. Zellenstadium jede Stunde eine Zellteilung ein.

2. Samenelemente

Die Samenelemente untersucht Pictet in der Weise, dass die Hoden zerzupft und die isolierten Elemente untersucht werden zum Studium

a) des Kernes: in 0,1—3 proz. wässeriger Essigsäure mit Dahlia und Methylgrün,
b) des Protoplasmas: in der Flüssigkeit von Ripart und Petit + einige Tropfen Osmiumsäure,
c) des Nebenkernes: in einer Lösung von Dahlia in Seewasser (Lee) + einige Tropfen einer Lösung von Dahlia in 0,1—3 proz. Essigsäure oder in Jodjodkaliumlösung.

[1]) Quart. Journal mikr. Sc. N. S. Vol. 40.

3. Fixation. (Hydra; Cordylophora)

Fixation. Ungeschalte Eier von Hydra fixierte Brauer mit Flemming'scher Lösung, beschalte mit heissem Sublimat. Cordylophora lac. Allmann behandelte Morgenstern ausser mit Flemming'scher Flüssigkeit und 5 proz. Sublimat mit folgendem Gemisch, das er ganz besonders rühmt:

Sublimat . . .	5
Eisessig	2
Wasser	100

Lang fixierte (Hydra) mit

1. 70 proz. Alkohol,
2. abs. Alkohol,
3. heisser Sublimatlösung,
4. Pikrin-Osmium-Essigsäure (vom Rath).

4. Färbung

Zur Färbung empfiehlt Häcker Essigkarmin (Schneider).

Echinodermata

Echinodermata

1. Fortpflanzung (Antedon)

Fortpflanzung. Für Antedon rosacea macht O. Seeliger die folgenden Angaben: Die Laichzeit fällt in Triest in den Juni, in Villafranca und Toulon in den April, in Neapel in den März, an der Küste Englands in den Juli.

Zur Erzeugung normaler Entwickelungsvorgänge darf der Luftstrom, der das Aquarium durchlüftet, nicht zu stark sein. In das Aquarium müssen einzelne Ulven kommen.

Die Furchung beginnt um 8 Uhr morgens; es ist das 8zellige Stadium nach 3 Stunden, das 16zellige nach $4^1/_2$ Stunden, die Blastula nach 7 Stunden entstanden. Die Entodermbildung fängt an in der 8. und 9. Stunde; sie ist vollendet nach 16 Stunden. Das Mesenchym entsteht nach 19 Stunden, der Schluss des Blastoporus tritt ein nach 26—36 Stunden. Das primäre Coelombläschen bildet sich nach 48 Stunden, seine Teilung tritt 10 Stunden später ein. Während am 4. Tage Coelom, Darm, Hydrocoel und Wimperkränze gebildet sind, ist das Kalkskelett am 5. Tage entstanden.

2. Künstliche Befruchtung

Künstliche Befruchtung. Die künstliche Befruchtung ist mit Erfolg unternommen worden bei Sphaerechinus granularis, Strongylocentrotus lividus, Echinus microtuberculatus, Asterias vulg. u. a. m. Man öffnet das Tier, bringt die Ovarialeier in eine Schale

mit Seewasser und setzt derselben in Seewasser verteiltes Sperma zu, bei dem man sich vorher von der Beweglichkeit der Spermatozoen überzeugt hat. Nach einiger Zeit erneuert man das Seewasser. Ungefähr 3 Minuten nach erfolgter Befruchtung hat sich die Eimembran deutlich abgehoben.

3. Ovarium (Asterina)

Ovarium. Fixation. Nach M. und P. Bouin eignen sich zur Fixation (speziell für Asterina gibbosa)

1. Flemming'sche Flüssigkeit,
2. Sublimat, in Kochsalzlösung gesättigt,
3. Formol-Pikrinsäure,
4. Hermann'sche Lösung, bei der die Osmiumsäure durch Formol ersetzt ist,
5. Carnoy'sche Flüssigkeit.
6. 1 proz. Platinchlorid 20
   Pikrinsäure, konz. wässer. . . 20
   Formol 10
   Ameisensäure 5

(Asterias)

Hartmann empfiehlt für Asterias glac. Sublimat mit 5 proz. Eisessig.

4. Männliche Geschlechtsorgane nach Field

Männliche Geschlechtsorgane. Zur Untersuchung der Samenelemente bediente sich G. W. Field folgender Methoden:

1. Untersuchung im frischen Zustande: Zerzupfung der Hoden. Behandlung des so gewonnenen Materiales mit
   a) wässeriger Methylgrünlösung allein oder zusammen mit einer Dahlialösung,
   b) Jod in Seewasser gelöst,
   c) 10 proz. Chlormagnesiumlösung und konz. wässeriger Dahlialösung,
   d) 0,1—0,3 proz. Essigsäure und Dahlia und Methylgrün,
   e) 33 proz. Essigsäure,
   f) Essigkarmin nach Schneider.

nach Pictet

(Ähnlich sind die Methoden von Pictet, der zur Färbung eine mit Dahlia gesättigte 10 proz. wässerige Lösung von Manganchlorür empfiehlt. Zum Studium des Kernes dient ihm 1—2 proz. Essigsäure, die mit Dahlia- oder Methylgrün versetzt ist, zur schnellen Fixierung isolierter Elemente eine 5 proz. Zinkchlorür- oder eine 1 proz. Platinchloridlösung.)

2. zur Fixierung der isolierten Elemente gebraucht Field Dämpfe der Osmiumsäure und
3. zur Fixierung der ganzen Hoden starke Flemming-sche Flüssigkeit oder Hermann'sche Lösung, beide für je 24 Stunden.

5. Befruchtete Eier

Befruchtete Eier. Zur Untersuchung der Echinodermeneier kann man sich der einfachen Methode von Boveri bedienen, die darin besteht, dass man die Eier künstlich befruchtet und ihre Entwickelung unter dem Mikroskop kontrolliert; dabei ist aber nach O. Hertwig folgendes zu beachten: Die Eier sind gegen Druck und Konzentrationsänderungen des Meerwassers ungemein empfindlich; setzt man z. B. einen frischen Tropfen Meerwasser zu den unter dem Deckglas befindlichen Eiern, so sterben sie leicht ab, eben wegen der zu schnellen Konzentrationsänderung. Ist nun das gewünschte Stadium in der Entwickelung erreicht, so lässt man unter dem Deckglase (nach Boveri) erst Schneider's Essigkarmin für 5—30 Minuten einwirken, darauf Eisessig und schliesslich Glyzerin.

Die Fixierung der Eier nimmt man, wie oben bei der Besprechung des Einbettens erwähnt, in stark gewölbten Uhrschalen oder in Röhrchen mit gewölbtem oder keilförmigem Boden vor. Auch das Ziegler'sche Durchströmungskompressorium kann zur Fixierung und Färbung dienen und zwar verfährt Ziegler dabei in folgender Weise: „Auf die Spiegelglasplatte (des Kompressoriums erster Form) wird ein kleines Deckglas gelegt und das Objekt mit einigen Wattefäden auf dieses Deckglas gebracht. Dann wird die Deckplatte aufgesetzt und die Durchströmung eingerichtet. Sobald sich das Objekt in dem gewünschten Stadium befindet, welches konserviert werden soll, bringe ich an dem Zuleitungsrohr anstatt des Hebers einen kleinen Trichter an. In diesen Trichter giesse ich nun die Reagentien, zuerst Schneider's Essigkarmin, dann der Reihe nach starke Essigsäure, Wasser, schwachen Alkohol, Mayer's Karmalaun oder eine andere Karminfarbe, darauf Wasser, angesäuerten schwachen Alkohol und schliesslich 90 proz. Alkohol.“ Infolge dieser Behandlung kleben die Eier, fixiert und gefärbt, an dem eingelegten Deckglas oder dem des Kompressoriums fest und können mit ihm in Nelkenöl und Kanadabalsam eingelegt werden. Die Larven von Antedon und Asteroides liessen Carpenter und Koch vor der Fixation sich an dünne Celloidinplatten, Kork-

platten oder in Kork eingeklemmte Deckgläschen ansetzen, die sie in das Aquarium taten. Die Celloidinplatten müssen gut ausgewaschen sein (Vosmaer).

a) Jüngere Stadien Fixation

Untersuchung jüngerer Stadien. Geeignete Fixierungsmittel sind:

Echinus microtuberkulatus

1. Pikrin-Essigsäure nach Boveri. Einwirkungszeit 24 Stunden, bei den Eiern von Echinus microtuberkulatus bis zu 8 Tagen. Nach der Fixation wird sofort Alkohol angewendet und zwar in der Weise, dass zu der das Material enthaltenden Fixierungsflüssigkeit zuerst 50 proz. Alkohol, dann 70 proz. Alkohol zugesetzt wird, bis die Objekte in 70 proz. Alkohol liegen. Dann weiter durch die höhere Alkoholreihe in Chloroform und Paraffin.

2. Verschiedene Mischungen von Pikrinessigsäure nach Morgan, so

Arbacia

a) eine gesättigte Pikrinsäurelösung wird mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und erhält einen Zusatz von 5 % Eisessig; für Arbacia

b) ges. Lösung v. Acid. picronitr 100
Wasser 200
Eisessig . . . . 1 %

c) ges. Lösung v. Pikrinsäure 100
Wasser 100
Eisessig . . . . 2 %

d) ges. Lösung v. Pikrinsäure 100
Wasser 200
Eisessig . . . . 6 %

Toxopneustes

All diese nach Morgan für Arbacia (und Chaetopterus); b) nach Wilson für Toxopneustes.

3. Sublimat. Man kann die gewöhnliche in Kochsalzlösung gesättigte Lösung anwenden oder dem Verfahren von Hammar folgen. Ihm kam es besonders darauf an, die Form und feinere Struktur des Ektoplasma zu konservieren. Er wendet zu seinem Zwecke eine konzentrierte Lösung von Sublimat in Seewasser für 15—30 Minuten mit nachfolgender vorsichtiger Alkoholbehandlung an. (Für die Eier anderer Tiere, der Coelenteraten, Würmer, Mollusken, Arthropoden, Vertebraten dampft er eine gewisse Menge Seewasser auf ihr halbes Volumen ein und sättigt diese dann mit

Sublimat. Die so erhaltene Sublimatlösung gebraucht er teils unvermischt, teils nach Zusatz derselben Menge einer in gewöhnlichem Seewasser gesättigten Sublimatlösung, teils nach Zusatz von einigen Tropfen einer 10 proz. Kochsalzlösung. All diese Methoden dienen ihm zur Darstellung der Verbindungen zwischen den Blastomeren.)

Amphiura

Bei Amphiura fixiert Russo mit einer heissen 2 proz. Sublimatlösung; aus ihr kommt das Material nach einigen Sekunden in die gleiche aber kalte Sublimatlösung.

4. Sublimat-Eisessiggemische.

a) Sublimat mit 2 % oder 5 % Eisessig nach Wilson und Morgan. Für Echinus microt., Sphaerechinus gran., Strongylocentrotus.

Antedon

b) Sublimat-Eisessig nach O. Seeliger für die Furchungsstadien bis zur Blastula von Antedon.

Man sättigt in filtriertem Seewasser Sublimat in der Wärme und setzt der noch heissen Lösung den 50. oder 60. Teil ihres Volumens an konzentrierter Essigsäure zu. Für alle anderen Stadien genügt die in Seewasser gesättigte Sublimatlösung.

5. Pikrinsäure.

6. Zenker'sche Flüssigkeit.

7. Pikrin-Schwefelsäure (Kleinenberg).

8. Flemming'sche Flüssigkeit mit nachfolgender Anwendung des Merkel'schen Gemisches.

9. Flüssigkeit von Perényi.

10. Osmiumsäure nach O. Hertwig. Die Eier werden mit $^{1}/_{10}$ proz. Osmiumsäure übergossen; in derselben bleiben sie 2 bis 5 Minuten; dann Wasser und Färbung in Beale'schem Karmin.

11. Pikrin-Osmium-Essigsäure.

12. Pikrin-Osmium-Platinchlorid-Essigsäure, beide nach vom Rath.

b) Ältere Stadien Fixation Antedon Amphiura Cucumaria

Untersuchung älterer Stadien. Fixation. Für Antedon Essigsublimat oder einfach eine in Seewasser gesättigte Sublimatlösung; für Amphiura 2 proz. Osmiumsäure oder die Dämpfe derselben, ferner Flemming'sche Flüssigkeit; für Cucumaria Abtöten in 50 proz. Alkohol, dann 70 proz. Alkohol. Wenn es darauf ankommt, die Kalktafeln zu erhalten, so fixiert man in absolutem Alkohol.

Seeigel

Seeliger empfiehlt zur Fixierung der Form für die Seeigel-

larven 10 proz. Formol. Um das Skelett zugleich mit den histologischen Details zu erhalten, übergoss er die Larven erst mit Osmiumsäure, wusch sie, wenn sie leicht gebräunt waren, 20 Min. in destilliertem Wasser und konservierte sie dann in absolutem Alkohol. Aufbewahrt wurden die Objekte in 96 proz. Alkohol, dem einige Tropfen Ammoniakwasser zugesetzt waren.

Literatur zu Kapitel 3 und 4

Fairchild, Zeitschr. wiss. Mikroskop., Bd. 12. — Schaffer, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 16. — Busk, cit nach Zeitschr. wiss. Mikroskp., Bd. 1, p. 277. — H. Virchow, Zeitschr. wiss. Mikroskop., Bd. 16. — L. Gerlach, Anatom. Anzeig., Bd. 2, 1887. — Peebles, cit. nach „Encyklopädie", Bd. 1, p. 280. — Preyer, Spez. Physiol. d. Embryo, Einleitung, p. 16. — H. E. Ziegler, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 14. — H. Landolt. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. 1894, Bd. 27, 3, p. 2872.

Maas, O., Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 67, 1900. — Minchin, Quart. Journ. mikrosk. Sc. N. S., Vol. 40. — Fiedler, Zeitschr. wiss. Zool., Bd. 47. — Sollas, Quart. Journ. mikroskop. Sc. 2 Ser. vol. 24. — Friedemann, Zeitschrift wiss. Zool., Bd. 71, 1902. — Hein, Zeitschr. wiss. Zool., Bd. 67, 1900. — Smith, cit. nach Zeitschr. wiss. Mikroskop., Bd. 9. — V. Häcker, Arch. mikrosk. Anat., Bd 40, 1892. — Pictet, Mitteilg. zool. Station Neapel, Bd. 10. — Brauer, Zeitschr. wiss. Zool., Bd. 52, 1891. — Morgenstern, Zeitschr. wiss. Zool., Bd. 70, 1901.

O. Seeliger, Zool. Jahrb. Abteil. Anat., Bd. 6. 1892 und Arch. Entwickelungsmech., Bd. 3. — M. u. P. Bouin, Bibliogr. anatom. T. 6, 1898. — Hartmann, Zool. Jahrb. Abteil. Anat., Bd. 15, 1902. — G. W. Field, Journ. of Morphol. vol. 11, 1898. — Pictet, Mitteil. zool. Station Neapel. Bd. 10. — Boveri, Jen. Zeitschr. Naturw., Bd. 24/35, 1890/1901. — Carpenter, cit. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk.. Bd. 7, 1890 — Koch, Mitteil. zool. Station Neapel, Bd. 3, 1882, — Morgan, Arch. Entwickelungsmech., Bd. 8, 10. — Hammar, Arch. mikroskop. Anat., Bd. 47, 49, 55. — Busso, cit. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk., Bd. 9. — Wilson, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 12. — Field, Quart. Journ. mikrosk. Sc. vol. 39.

Kapitel 5

Vermes[1]

Turbellaria
1. Fortpflanzung
Mikrostoma

Thysanozoon

2. Männliche Geschlechtsorgane

Turbellaria. Fortpflanzung. F. v. Wagner gelang es, Mikrostoma in Zuchtaquarien lebend zu erhalten. Diese Aquarien waren 15 cm lang, 10 cm breit und 6 cm hoch; ihr Boden wurde mit dünner Schlammschicht bedeckt, das Wasser wöchentlich gewechselt. Die Laichzeit von Thysanozoon beginnt in Neapel Ende April oder im Mai und dauert den ganzen Sommer hindurch (V. Häcker).

Männliche Geschlechtsorgane. Für fertig gebildete Spermatozoen gebraucht W. Repiachoff die folgenden Methoden

1. Das ganze Tierchen wurde der Einwirkung der Hertwigschen Osmium-Essigsäure ausgesetzt, dann ein bis mehrere Stunden in mit Essigsäure angesäuertem Meerwasser mazeriert. Nun zerquetschte er das Tier und setzte schliesslich den so erhaltenen Präparaten noch ein Tröpfchen Glyzerin zu.
2. „Behandlung des ganzen Tierchens mit 2proz. Osmiumsäure (einige Sekunden, höchstens 1—2 Minuten) Färbung mit Beale's Karmin. Quetschen. Untersuchung in Beale's Karmin, Glyzerin, oder in einem Gemisch von diesen beiden Flüssigkeiten, bisweilen mit Zusatz von Meerwasser.“
3. „Behandlung des ganzen Tieres mit einem Gemisch von Meerwasser und 2proz. Osmiumsäure (etwas längere Zeit, doch höchstens einige Minuten). Färbung mit Beale's Karmin (die Farbe wurde in diesem Falle dem Gemisch von Meerwasser und Osmiumsäure einfach zugesetzt und die Tiere in dieser Flüssigkeit mehrere (bis 24) Stunden gelassen). Zerquetschen, Untersuchung in derselben Flüssigkeit manchmal mit Zusatz von etwas Glyzerin.“

[1]) Die Methoden von Hammar zur Darstellung der Verbindungen zwischen den Blastomeren siehe Seite 79 unter 3 (Sublimat).

4. Das Tier wird lebend zerquetscht und dem so erhaltenen Präparat erst 2proz. Osmiumsäure und nach einigen Sekunden Beale's Karmin zugesetzt.

Fixation. Um Schnittpräparate zu bekommen, fixieren F. v. Wagner die Tiere

3. Fixation

1. in auf 60° erwärmte konzentrierte wässerige Sublimatlösung,
2. in Lang'scher Flüssigkeit,
3. in $^1/_2$ proz. Osmiumsäure;

Repiachoff in

1. Sublimat,
2. Kleinenberg's Flüssigkeit;

O. van der Stricht bei Thysanozoon in

1. Sublimat,
2. Flemming'scher,
3. Hermann'scher Flüssigkeit, wobei er dem letzteren Mittel den Vorzug gibt.

In der Flemming'schen und Hermann'schen Lösung lässt er sein Material 10 Tage bis mehrere Wochen und härtet es schliesslich nach erfolgtem Auswaschen in allmählich verstärktem Alkohol.

Eier der Polycladen. Um Totalpräparate herzustellen, fixiert Francotte in 3proz. Salpetersäure, der Perényi'schen Flüssigkeit, mit besonders gutem Erfolge aber in dem Hermann'schen oder Fol'schen Gemisch. Letztere beiden wirken nur so lange ein, bis die opaken Granula nicht mehr wahrzunehmen sind und das cytoplasmatische Gebälk erscheint, was man unter dem Mikroskop feststellen muss. Darnach kommen die Eier in

4. Polycladen

Glyzerin	15
90proz Alkohol	15
Wasser	70

Für die Färbung der ganzen Eier gebraucht er als Lösungsmittel seiner Farben eben dieses Gemisch. Seine zahlreichen Färbungsmittel sind die folgenden:

1.	Glyzerin	15
	90proz. Alkohol	15
	Wasser	70
	Thionin	0,3

2. Glyzerin 15
   90 proz. Alkohol 15
   Wasser 70
   Methylgrün 0,1
   Essigsäure . . . . 1 Tropfen
3. Glyzerin 15
   90 proz. Alkohol 15
   Wasser 70
   Malachitgrün 0,05
   Vesuvin 0,1
4. Glyzerin 15
   90 proz. Alkohol 15
   Wasser 70
   Orange G 0,1
   Säurefuchsin 0,01
   Methylgrün 0,01
   Essigsäure . . . . 1 Tropfen.

Zur Herstellung von Paraffinschnitten tötete er die Eier ab in

Sublimat, in dest. Wasser ges. . . . 100
Eisessig 5

oder in Osmiumsäure haltenden Gemischen, dem Flemming'schen und dem Fol'schen Gemisch. Er ging so vor, dass er die Eier erst auf kurze Zeit in die schwache Flemming'sche Lösung, dann in die Fol'sche Flüssigkeit brachte. Zur Färbung der Schnitte bediente er sich der Heidenhain'schen Hämatoxylinfärbung mit der Abänderung, dass er mit dem Tartrat in einer Lösung von 3 bis 3,5 g auf 100 H_2O beizte, die Differenzierung aber wie üblich vornahm. Von ihm angegeben und erprobt sind auch folgende Methoden. Die Schnitte kommen der Reihe nach in Xylol, absoluten Alkohol, eine in absolutem Alkohol gesättigte Methylgrünlösung mit 1 Tropfen Eisessig auf 100 ccm Flüssigkeit und zwar so lange bis reine Kernfärbung eingetreten ist; dann absoluter Alkohol, Xylol, Balsam. Oder Xylol, absoluter Alkohol und folgende Mischung:

Alkohol abs. 100
Säurefuchsin 0,01
Methylgrün 0,1
Eisessig . . . . 1 Tropfen,

dann absoluter Alkohol, Xylol, Balsam.

Prostheceraeus vittatus fixiert Klinkowström in der Flüssigkeit von Perényi oder in einer Mischung von 100 Teilen 70 proz. Spiritus und 4 Teilen Eisessig.

Prostheceraeus vittatus

Trematodes. Für die Untersuchung der in Schnecken lebenden Cercarien in lebenden Zustand verwendet Biehringer die Blutflüssigkeit des Wirtes; zur Fixation derselben empfiehlt er Chromsäure, mit Essigsäure versetzte Chromsäure, Pikrin-Schwefelsäure, Sublimat und Osmiumsäure, während heisses Wasser schlechte Resultate gibt.

Trematodes Cercarien

Für die Erlangung von Polystom. integ. spielt nach den Erfahrungen von Goldschmidt die Gegend, in der die untersuchten Frösche leben, eine Rolle. So fand er, dass nur die bei Hockenheim vorkommenden Frösche, aber nicht die um Heidelberg lebenden infiziert waren. Die infizierten Frösche wurden nach der Zeller'schen Methode im warmen Zimmer in hohen Gläsern aufbewahrt, „deren Boden etwa 2 cm hoch mit Wasser bedeckt war“. In diesem Wasser findet man die Eier in Menge; man ist allerdings bei der Untersuchung auf eine bestimmte Jahreszeit, dem ersten Frühjahr, als dem günstigsten Zeitpunkt, angewiesen. Zum Zweck der Konservierung bringt man die Eier in ein Uhrschälchen und übergiesst sie mit kochendem Wasser und kühlt sie dann schnell ab. Mit der Fixation durch die Hitze kombiniert man dann noch die durch Alkohol-Essigsäure in folgender Mischung: 95 proz. Alkohol 4, 43 proz. Essigsäure 1. Dieses letztere Mittel muss den Eiern sehr vorsichtig zugesetzt werden; danach kommen dieselben zum Auswaschen der Essigsäure in 50 proz. Alkohol; dieser wird ganz allmählich gesteigert. Zur Färbung in toto eignete sich nur Essigkarmin bei langer Einwirkung in der Wärme, zur Schnittfärbung Hämatoxylin nach van Gieson oder Boraxkarmin mit Bleu de Lyon-Nachfärbung.

Polystomum integ.

Cestodes. Zur Fixation von Cestoden empfehlen Grassi und Rovelli die Kleinenberg'sche und die Flemming'sche Flüssigkeit. van Beneden fixiert die Eier von Taenia mit 1 proz. Osmiumsäure; dann 30 proz. Alkohol 1 Stunde, Wasser, Pikrokarmin (2 bis 3 Tage), Glyzerin und Pikrokarmin. Sprengung der Hülle älterer Taenia-Embryonen (nach van Beneden): Die Embryonen kommen auf den Objektträger unter das Deckglas; dann

Cestodes



Absaugen der sie einschliessenden Flüssigkeit bis der Druck des Deckglases die Hülle sprengt.

Nemertini
1. Künstliche Befruchtung Cerebratulus

Nemertini. Künstliche Befruchtung. Nach Coe schneidet man bei Cerebratulus den weiblichen Wurm auf der Rückenseite auf: bei reifen Eiern werden dieselben durch die Muskelkontraktionen herausgetrieben. Von Sperma, das man dadurch erhält, dass ein reifes Männchen am Hinterteil angestochen wird, darf nur wenig genommen werden, um Überfruchtung zu verhüten.

2. Männliche Geschlechtsorgane Tetrastemma

Männliche Geschlechtsorgane. Bei Tetrastemma bewährte sich nach Lee als bestes Fixationsmittel eine konzentrierte Lösung von Sublimat mit einem Zusatz von 1 % Eisessig.

3. Eier Cerebratulus

Die Eier von Cerebratulus fixiert Coe in Sublimat-Eisessig (2—3 % Eisessig) oder in Pikrin-Essigsäure nach Boveri. Die Dauer der Fixation beträgt 5 Stunden; dann mehrmals gewechselter 70 proz. Alkohol und Aufbewahren in 80 proz. Alkohol.

Nematodes
Askaris

Nematodes. Askaris. Unter den Askaridae ist am häufigsten der Pferdespulwurm, Askaris megalocephala untersucht worden. In seinen langen Geschlechtsröhren schliessen sich die einzelnen Reifungsstadien der Ei- und Samenzellen und die Stadien des Befruchtungsprozesses kontinuierlich vom Anfang bis zum Ende der Röhren an einander an. Die bei dem weiblichen Wurm im Uterus liegenden Eier, die kurz vor der Ablage stehen, zeigen die beiden Richtungskörperchen und den Ei- und Samenkern; auf sie folgen nach dem Anfang der Eiröhre hin alle jüngeren und jüngsten Eier. Ebenso findet man in der Hodenröhre am Anfang die jüngsten, am Ende die ältesten Stadien des Reifungsprozesses der Samenzellen. In Abbildung 17a und 17b sind nach einem Präparat des Anat. biolog. Instituts die männlichen (Abbildung 17a) und weiblichen (Abbildung 17b) Geschlechtsorgane von Askaris dargestellt.

Widerstandsfähigkeit der Eier

Widerstandsfähigkeit der Eier. Die im Endabschnitt der Eiröhre enthaltenen Eier sind von einer dicken und derben Kapsel umgeben, der sie ihre Widerstandsfähigkeit äusseren Einflüssen gegenüber verdanken. So furchen sie sich in den verschiedensten Medien. Im 30 proz. Alkohol tritt die Gastrulation nach 8—9 Tagen ein, während die Ausbildung der fertigen Würmer 4—5 Wochen in Anspruch nimmt. Auch 60 proz. Alkohol übt keinen nachteiligen Einfluss auf sie aus, 70 proz. dagegen tötet sie

nach 2—3 Tagen, 80proz. nach 2—3 Stunden (Nussbaum). Durch den 70proz. Alkohol werden in ein und demselben Eischlauch die einen Eier früher, die andern später abgetötet; man kann daher manchmal in einer Eiröhre alle auf einander folgenden Stadien der Entwickelung des Wurmes erhalten (Boveri). Für dieses verschiedene Verhalten der Eier gibt es bisher keine sichere Erklärung.

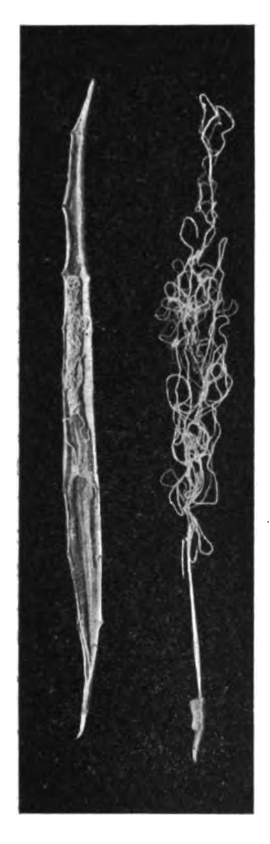


Fig. 17 a.

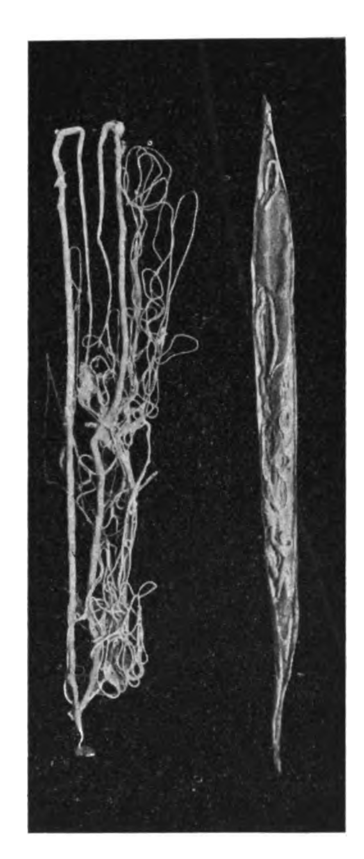


Fig. 17 b.

van Beneden ist der Ansicht, dass die Eier durch die dickere oder dünnere Schale mehr oder weniger lange gegen das Reagenz geschützt sind und dass sie momentan absterben, wenn sie mit ihm in Berührung kommen. Bataillon sucht die Eigentümlichkeiten in der Widerstandsfähigkeit der Askariseier durch plasmolytische

Vorgänge zu erklären. Auch eine Einwirkung einer 2proz. Lösung von doppelt chromsaurem Kali und der Flemming'schen Lösung überstehen sie; letztere bei einer Einwirkungszeit von 25 Minuten (Munk und Nussbaum).

Furchungsstadien

Furchungsstadien. Infolge dieser Widerstandsfähigkeit kann man leicht Furchungsstadien erhalten. Schüttet man die Eier aus dem Uterus in ein Uhrschälchen, so machen sie bei einer feuchten Temperatur von 25° C. ungefähr nach 12 Stunden die Furchung durch (van Beneden-Neyt); nach Hallez sind, um alle Phasen der Entwickelung zu beobachten, bei 20—25° C. 8 bis 10 Tage erforderlich. Bindet man das untere Ende des Eischlauches ab und legt dasselbe in die feuchte Kammer, so furchen sich die Eier ebenfalls. So kann man sich bequem Material für Zell- und Kernteilungsstadien verschaffen. Man muss sich nur davor hüten, dass während des Aufenthaltes in der feuchten Kammer ein Wassertropfen auf den Schlauch fällt, weil dieser sonst leicht platzt und ein auch nur teilweiser Austritt seines Inhaltes die Fixation der zurückgebliebenen Eier ungünstig beeinflusst. Dies vermeidet Zoja mit seiner Methode. Er bringt den Uterus auf 2—3 Stunden in 50proz. Alkohol, der nur die Muskulatur erhärtet, die Eier wie bekannt unbeeinflusst lässt. Nach dieser Zeit nimmt er das Objekt heraus und hebt es trocken auf. Die Eier entwickeln sich weiter. Zacharias bringt zu dem gleichen Zweck die möglichst frisch dem Pferdedarm entnommenen Würmer, bevor er sie öffnet, auf 2 bis 3 Stunden bei 20° R. auf Watte, die mit 3proz. Kochsalzlösung angefeuchtet ist und deckt sie mit ebensolcher zu. Dann ist bei jüngeren Eiern die Richtungskörperbildung, bei älteren die Segmentation in vollem Gange. Nach Kultschitzky darf man zum Studium der Richtungskörperbildung nur absolut frisches Material d. h. unmittelbar nach der Herausnahme des Wurmes aus dem Wirt verwenden, während für den Furchungsprozess der Wurm tot sein kann, aber nicht länger als 3—4 Stunden. Er wird dann bei 35 bis 38° C. in die feuchte Kammer gebracht, für die ersten Furchungsstadien auf einige Stunden, für die späteren, nach der vierten Teilung, auf 2—3 Tage oder länger.

Präparation der Schläuche

Herauspräparieren der Schläuche. Man bringt die lebenden Würmer in eine mit schwarzem Wachs ausgegossene Schale entweder unter erwärmter physiologischer Kochsalzlösung oder trocken

und befestigt ihr Vorder- und Hinterende durch je eine Nadel. Dann vorsichtiges Spalten des Hautmuskelschlauches von vorn bis hinten in der Längsrichtung des Wurmes, ohne die dicht unter ihm liegenden Schlingen der Geschlechtsröhren zu verletzen. Durch Nadeln werden die Hälften des durchschnittenen Hautmuskelschlauches zur Seite gehalten. Nun kann man entweder die Geschlechtsorgane mitsamt dem Darm, dem sie dicht anliegen, fixieren und sie erst später, doch vor der Behandlung mit Alkohol von ihm trennen (Brauer) oder man isoliert die Sexualröhren schon vorher und fixiert sie allein. Bei der ganzen Präparation ist Vorsicht nötig; eine auch geringe Verletzung der Geschlechtsschläuche zieht einen teilweisen Austritt ihres Inhaltes nach sich und macht sie zur Fixation unbrauchbar.

Untersuchung der lebenden Eier

Untersuchung der lebenden Eier. Nach van Beneden in der Blutflüssigkeit der Askariden oder in einem abgeänderten Kronecker'schen Serum, nämlich

Aq. dest.	100
Natriumchlorür	6
Soda	0,06

Fixation

Fixation. Die angewandten Fixationsmittel sind zahlreich; denn die älteren Eier erschweren durch ihre derbe und undurchlässige Hülle die Fixation ungemein. Man hat auch bei dem Fixieren mit individuellen Schwankungen zu rechnen. Sehr oft ereignet es sich, dass unter den hüllenlosen Eiern diejenigen der einen Region der Sexualröhre gut fixiert, die einer andern dagegen ausnahmslos geschrumpft sind. Boveri äussert die Meinung, dass unter Anwendung kalter Fixierungsflüssigkeiten leicht pathologische Bilder erhalten werden können und empfiehlt daher die Anwendung von siedendem Alkohol unter Zusatz von 1 % Eisessig, während im Gegensatz zu ihm Carnoy und van Gehuchten diese Methode gerade wegen ihrer stürmischen Einwirkung für nicht einwandsfrei erachten. Nach den vergleichenden Beobachtungen von Carnoy werden die Eier, welche sich auf dem Stadium des I. Polkörperchens befinden, schnell abgetötet durch: Fluor-Wasserstoffsäure und Brom, schwefelige Säure und Alkohol, Aceton und schwefelige Säure haltenden Alkohol, siedendes Wasser und Alkohol, und zwar fixieren die ersteren Methoden die Eier und die Kernteilungsfiguren gut,

während kochendes Wasser und siedender Alkohol quellend wirken. Für die Eier mit resistenten Hüllen gebraucht man am besten Mischungen von starkem Alkohol und starker Essigsäure, mit oder ohne Zusatz von Chloroform. Ohne jede Flüssigkeit fixiert Platner die Eier von Askaris nur durch Erhitzen auf etwa 50° C. Er bringt die Eischläuche in dünnwandige Reagenzgläschen und taucht diese unter beständigem Herumschwenken auf 20—40 Sekunden in heisses Wasser; dann Alkohol von steigender Konzentration. Im einzelnen sind die angewandten Fixations- und Färbungsmethoden die folgenden.

nach Platner

nach van Beneden

van Beneden erwähnt, dass 1proz. Osmiumsäure bei einer Einwirkungsdauer von einigen Sekunden verbunden mit einer Färbung in Pikrokarmin nur brauchbar ist bei den Stadien bis etwa zur Kopulation der Geschlechtsprodukte. Sonst verfährt er derartig, dass er die Teile der Eiröhre, welche die jüngeren Eier enthalten, in 3proz. Salpetersäure zerzupft, wobei er die Säure 1 Stunde einwirken lässt; dann wäscht er mit Alkohol aus und färbt mit Boraxkarmin, Fuchsin oder Methylgrün. Schliesslich kann man nach ihm auch mit 30proz. oder 70proz. Alkohol fixieren und mit Pikrokarmin oder Boraxkarmin färben.

nach van Beneden-Neyt

van Beneden-Neyt fixierten später die Eier auf dem Objektträger in einer Mischung von gleichen Teilen absoluten Alkohol und Eisessig und färbten dann sofort mit Drittelglyzerin, dem sie ein geringes Quantum sowohl einer wässerigen Lösung von Malachitgrün wie von Vesuvin zusetzten. Die Färbungszeit der Kernteile beträgt eine Stunde, doch können die Eier ohne Schaden auch länger, Wochen und Monate, in der Färbungsflüssigkeit liegen bleiben. Will man entfärben, so kann man dies mit Wasser, das mit Essigsäure angesäuert ist oder mit verdünntem Glyzerin oder mit reinem Wasser erreichen.

Auch die ganzen Eischläuche können in ähnlicher Weise behandelt werden. Sie kommen auf 24 Stunden in absoluten Alkohol-Eisessig āā. Während dieser Zeit stellt man sich durch heisses Lösen von Bismarckbraun (Grübler) eine 1proz. wässerige Lösung dieses Farbstoffes her, kühlt ab und filtriert. Aus der Fixationsflüssigkeit gelangen die Eischläuche sofort in diese Färbeflüssigkeit, in der sie 2—3 Tage verweilen. Nun setzt man allmählich Glyzerin zu der Bismarckbraunlösung hinzu und zwar so lange, bis man eine

mit Bismarckbraun gefärbte Drittelglyzerinlösung erhält. Hierin werden die Schläuche aufgehoben.

nach Carnoy
a) Fixation isolierter Eier

Die zahlreichen von Carnoy veröffentlichten Methoden scheiden sich in solche, die auf die einzelnen Eier und in andere, die auf die ganzen Eiröhren zum Zwecke späterer Mikrotomierung einwirken. Zu den ersteren gehören die folgenden. Man entleert ein kleines Stück des Eischlauches auf dem Objektträger in einen Tropfen einer Methylgrünlösung, die 2—3 % Essigsäure enthält; so werden die Eier gut erhalten und können auf dem Objektträger leicht ausgebreitet werden. Darauf erfolgt ihre Fixation mit

a) 3proz. Salpetersäure, Drittelalkohol und 70proz. Alkohol nach van Beneden; mit dem Drittelalkohol werden sie so lange gewaschen, bis alle Säure entfernt ist. Dann 70proz. Alkohol.
b) absolutem Alkohol, in welchem schwefelige Säure gelöst ist.

Bei den Eiern von Askaris clavata gebrauchte Carnoy einen Alkohol „renferment près de 200 fois son volume d'anhydride sulfureux". Auf die im Methylgrün liegenden Eier bringt man einen Tropfen dieses Alkohols, bis das Methylgrün vollkommen entfärbt ist. Dann wäscht man mit reinem absolutem Alkohol, bis jede Spur schwefeliger Säure entfernt ist. Andere Mittel, die Carnoy aut die isolierten Eier einwirken liess, waren

1. Mischungen von Alkohol und Essigsäure und zwar
   a) Alkohol abs. 3, Eisessig 1 mit nachfolgendem Waschen in absolutem Alkohol.
   b) Alkohol abs. 6
      Eisessig 1
      Chloroform 3
2. Aceton, das wie der oben erwähnte Alkohol schwefelige Säure enthält („l'acétone renferment jusqu'à 400 fois son volume du même gaz").
3. Siedendes Wasser, heisser Alkohol, Alkohol in verschiedenen Verdünnungen.
4. Dämpfe der schwefeligen Säure, der Osmiumsäure, des Broms und der Fluorwasserstoffsäure.

Die Färbung der fixierten Eier erfolgt in allen Fällen mit Methylgrün, die Aufbewahrung in Glyzerin-Benzoesäure nach Gilson, nämlich

Glyzerin	50 g
Wasser	50 „
Eisessig	10 „
Benzoësaures Natron	20 cg

b) Fixation ganzer Schläuche

Die Fixierung der ganzen Sexualschläuche oder von einzelnen Teilen derselben nahm Carnoy in folgender Weise vor:

1. Das Material wird ebenso, wie es vorher für die isolierten Eier auseinander gesetzt wurde, mit 3proz. Salpetersäure behandelt.
2. Man wendet schwefelige Säure haltigen Alkohol an, in welchem die Objekte je nach der Dicke der Eimembran 1—8 Stunden bleiben; dann Alkohol.
3. Die Eischläuche gelangen in Sublimatlösung nach Gilson auf 20 Minuten bis 1 Stunde, dann Wasser, Alkohol.

Für das Stadium mit derben Eihüllen ist sehr gut das Carnoysche Alkohol-Chloroform-Eisessiggemisch, wie es oben erwähnt wurde. Die Objekte verweilen in dieser Mischung mehrere Stunden; manchmal ist es von Vorteil, den Eisessiggehalt zu verringern. So erhielt ich bei einer Einwirkung von 24 Stunden gute Resultate bei folgender Zusammensetzung des Gemisches:

Alkohol abs.	30
Chloroform	15
Eisessig	0,5—1

Ersetzt man in der alten Carnoy'schen Formel den Eisessig durch rauchende Salpetersäure, so erhält man ebenfalls brauchbare Resultate. Die Fixationsdauer beläuft sich dabei auf 24 Stunden. In allen diesen Fällen kommen nach erfolgter Fixation die Objekte in absoluten Alkohol und dann langsam durch Chloroform in Paraffin. Carnoy und Lebrun haben ferner zur Herstellung von Schnittpräparaten folgendes Fixierungsgemisch empfohlen:

nach Carnoy und Lebrun

Alkohol abs.	1
Eisessig	1
Chloroform	1
korros. Sublimat	bis zur Sättigung.

Meine hiermit angestellten Versuche haben aber kein zufriedenstellendes Ergebnis gehabt.

nach Boveri (Askaris lumbricoides u. megal.)

Boveri fixiert entweder (bei A. lumbricoides) mit 30—70 proz. Alkohol, ferner mit 70 proz. Alkohol 100, Eisessig 5 oder bei A. megal. mit seiner Pikrin-Essigsäure auf 24 Stunden. Dann auswaschen in 70 proz. Alkohol, das lange fortgesetzt werden muss; darauf erfolgt Färbung der Eischläuche in Boraxkarmin auf 24 Stunden und eine ebenso lang dauernde Behandlung mit salzsäurehaltigem Alkohol. Sodann kommt das Material in reinen Alkohol und schliesslich in folgende Glyzerinmischung: Glyzerin 1, Alkohol abs. 3. Aus derselben verdunstet nach und nach der Alkohol, sodass die Eier auf diese Weise in reines Glyzerin übergeführt werden. Ferner gebraucht er siedenden absoluten Alkohol mit 1 proz. Eisessig. Die Schläuche bleiben bis zum Erkalten der Mischung in derselben. Gegen die Anwendung dieser Methode erheben, wie oben erwähnt, Carnoy und van Gehuchten Einspruch.

nach Zacharias

Zacharias wandte folgende Fixierungsflüssigkeit an: starker Alkohol 4, Eisessig 1; auf 10 ccm dieses Gemisches kommen noch 2—3 Tropfen einer 1 proz. Osmiumsäure und etwas Glyzerin oder Chloroform. Es bleiben in dieser Flüssigkeit die Eier aus dem oberen Drittel (der 25—30 cm langen Schläuche) 5—7 Minuten, aus dem mittleren Drittel 10—15 Minuten, aus dem unteren Drittel bei gewöhnlicher Temperatur 20—25 Minuten, bei 40 ° C. 10—15 Min. Nach der Fixation kommt das Material auf 2—3 Stunden in abs. Alkohol und wird schliesslich in 70 proz. Alkohol aufbewahrt. Färbung in verschiedener Weise:

1. mit Essigkarmin; die jüngeren Stadien bleiben in der Farbe 2—3 Stunden, die älteren 8—10 Stunden. Die Präparate sind anfangs sehr schön, blassen aber später ab.
2. Färbung der Eischläuche 10—12 Stunden in alkoholischem Boraxkarmin. Dann kommen sie sofort in eine 2 proz. mit etwas Glyzerin versetzte Methylgrünlösung auf 1 bis 2 Tage zur Färbung des Cytoplasma. Ob der Färbungseffekt erreicht ist, ergeben die den Schläuchen entnommenen Proben.
3. Zur Färbung der Spindelfasern Modebraun in dünner wässeriger Lösung. Aufgehoben werden die Eier in Glyzerin 2, Wasser 1.

nach Kultschitzky (Askaris megal. u. marg.)

Kultschitzky fixiert sein Material (Askaris megal. und Askaris marg.) entweder in Alkohol-Essigsäure āā (van Beneden) oder in essigsaurem Äther, den er sehr empfiehlt; er verwendet ihn in zwei Mischungen:

1. essigsaurer Äther 3, abs. Alkohol 1,
2. essigsaurer Äther 3, Aq. dest. 1.

Zur Färbung benutzt er

1. Essigkarmin,
2. Lösungen von Aurantia und Gentiana in Kreosot.

„Dabei geschieht Färbung und Aufhellung zu gleicher Zeit." Einschliessen der Präparate in Balsam. K. verfährt dabei folgendermafsen:

1. wird das Material in starker Essigsäure entwässert und in einer Mischung von Essigsäure und Balsam eingeschlossen,
2. wird das Material in einer Mischung von Alkohol und Essigsäure āā entwässert und in Kreosot aufgehellt; dann Einschluss in Kreosot-Balsam.

nach Lukjanow

Lukjanow brachte die Sexualröhren beim Spulwurm des Hundes und die dünnsten Teile der Genitalschläuche bei Askaris megal. in eine auf 38 ° C. erwärmte konz. wässerige Sublimatlösung und liess sie 1—2 Stunden in derselben; sie wurden in Aq. dest. ausgewaschen und kamen dann in Alkohol. Über sein Einbettungsverfahren siehe S. 48.

nach Wasielewski

Die Knäuel am Ende der Keimzone von Askaris megal. fixiert v. Wasielewski in Pikrin-Essigsäure, wäscht den Alkohol aus und färbt die Schnitte mit Alaunfuchsin. Der Wasielewski'sche Knäuel ist $^1/_8$ bis $^1/_4$ mm gross und bildet den Abschluss der feinen weisslichen, äusserst dünnen Schläuche, die man mit Präpariernadel und Lupe bis zu ihm verfolgen muss.

nach Brauer (Spermatogenese)

Beim Studium der Spermatogenese von Askaris megal. gebraucht Brauer zwei verschiedene Fixierungsmittel, je nachdem er das Chromatin oder Achromatin untersuchen will. Zu dem ersteren Zwecke verwendet er konz. Sublimatlösung, zu letzterem Hermannsche Flüssigkeit mit Nachbehandlung mit rohem Holzessig.

nach Zoja

R. Zoja bediente sich zur Fixierung der Genitalorgane von Askaris megal. für das Stadium mit den derben Eihüllen 1893 einer

Alkohol-Eisessigmischung von van Beneden (Alkohol-Eisessig āā), die er aber ausserdem noch mit Sublimat sättigte, für die übrigen Eier einer konz. Sublimatlösung; 1896 fixierte er die Eier zum Studium in toto in der von Herla angegebenen Mischung, nämlich Alkohol abs. 5, Eisessig 1. Die Objekte blieben darin 24 Stunden und kamen dann sofort in eine in der Wärme gesättigte und nach dem Erkalten filtrierte Bismarckbraunlösung auf 48 Stunden. Aufgehoben wurden die Eier in Drittelglyzerin. Herla selbst färbte (die einzelnen Eier in der feuchten Kammer) mit

nach Herla

Vesuvin	0,25
Malachitgrün	0,25
Aq. dest.	100
Glyzerin	10

und entfärbte mit 10 proz. oder 30—50 proz. Glyzerin. Zur Anfertigung von Schnitten konserviert Zoja sein Material in dem gleichen Alkohol-Eisessiggemisch (5 : 1), nur fügte er zu demselben auf 2—3 ccm noch einen Tropfen einer 10 proz. Platinchloridlösung hinzu. Diese Fixierungsflüssigkeit wirkte 24—48 Stunden ein und wurde dann durch mehrmals gewechselten absoluten Alkohol ersetzt.

nach v. Erlanger

v. Erlanger empfiehlt als bestes Fixationsgemisch eine Mischung von Eisessig 20,95 proz. Alkohol 80. Hebt man die Eiröhren hierin auf, so lassen sich späterhin die einzelnen Eier leicht von einander isolieren. Zur Färbung bringt man sie aus dieser Mischung sofort in Lösungen von Anilinfarben in verdünntem Glyzerin. Solche sind

1. ein Gemisch von gleichen Teilen Jodgrün und Bismarckbraun in 10 proz. Glyzerin,
2. ein Gemisch von 2 Teilen Jodgrün und 1 Teil Säurefuchsin in 10 proz. Glyzerin.

Für die Schnittmethode kommt das Material aus der Fixierungsflüssigkeit in 95 proz. Alkohol, der, so lange noch ein Eiessiggeruch wahrzunehmen ist, erneuert werden muss. Sabaschnikoff fixierte in 3 proz. Salpetersäure, Sublimat-Eisessig oder im Rath'schen Pikrin-Essig-Osmium-Platinchloridgemisch.

nach Sabaschnikoff

Kostanecki und Siedlecki fixieren in

nach Kostanecki u. Siedlecki

1. Sublimat (konz. in physiol. Kochsalzlösung), oder
2. Sublimat und 30 proz. Salpetersäure und
3. Sublimat, Alkohol abs., Eisessig aa für 24 Stunden.

Über ihr Einbettungsverfahren siehe S. 47.



nach vom Rath u. Häcker

Wie Sabaschnikoff empfehlen vom Rath und Häcker die Platinchlorid-Osmium-Pikrin-Essigsäure für 48 Stunden, nebst Behandlung mit rohem Holzgeist und Methylalkohol (je 24 Stunden) oder Färbung mit Hämatoxylin (Delafield).

nach Fürst (Centrosomen)

Eine ganze Anzahl von Fixierungsflüssigkeiten hat Fürst auf ihre Brauchbarkeit zur Darstellung der Centrosomen bei Askaris megal. hin untersucht. Es bewährten sich: Pikrin-Essigsäure, Perényi'sche Flüssigkeit, konz. Sublimat mit 5 proz. Eisessig, Flemming'sche Flüssigkeit, 3 proz. Salpetersäure mit 70 proz. Alkohol mit und ohne 5 proz. Eisessig.

Askaris lumbric.

Andere Nematoden. Die Eier von Askaris lumbricoides, Strongylus paradoxus, Rhabdonema nigrovenosa fixiert Bonnevie auf 6—8 Tage in 70 proz. Alkohol 95, Eisessig 5. Den stark färbbaren äusseren Überzug der Eischale, der bei Untersuchung ganzer Eier oft stört, entfernt er durch Einlegen der Eier vor der Fixation in warme Pepsinlösung auf einen Tag.

Strongylus paradoxus

Strongylus paradoxus. Die die Würmer enthaltenden Lungenspitzen kommen in auf Körpertemperatur erwärmte 0,5 proz. Kochsalzlösung, in der die Eischläuche herauspräpariert werden. Fixation in Pikrin-Essigsäure (Spemann). Zum Studium der Centrosomen empfiehlt O. Meyer in erster Linie die Perényi'sche Flüssigkeit zur Fixation, während allerdings das Chromatin durch dieselbe nicht gut fixiert wird.

Rhabditis nigrovenosa

Die Eier von Rhabditis nigrovenosa untersucht Nussbaum im Humor aqueus des Froschwirtes; um sie im gehärteten Zustande zu studieren, lässt er „die weiblichen Genitalschläuche aus einer dicht vor dem hinteren Leibesende gemachten queren Wunde austreten. Wenn dies durch die Kontraktion des sonst unversehrten Hautmuskelschlauches auf einem sauberen trockenen Objektträger bewerkstelligt war, wurden die ganzen Tiere mitsamt dem Objektträger in die Härtungsflüssigkeit eingelegt. Das Hervorschiessen von Uterus und Eileiter nebst Eiröhre geht bei dieser Methode so schnell, dass keine Verdunstung erfolgt und dabei liegt das Präparat so glatt und gestreckt, dass es später bequem eingebettet werden kann und zugleich eine gute Orientierung erlaubt. Ausserdem hat diese Präparation den Vorteil, dass die Konservierungsflüssigkeiten fast momentan tötend auf die Eier wirken können. Eine Verletzung

der inneren Geschlechtswerkzeuge ist bei einiger Übung ausgeschlossen. Bedingung für das Gelingen der Präparation ist die tadellose Zusammenziehung des Hautmuskels; das Tier darf weder mit einer Pinzette gequetscht, noch an irgend einer anderen Stelle als an dem angelegten Querschnitte des hinteren Leibesendes verletzt sein." Die Befruchtungs- und ersten Teilungsstadien liegen „in dem Bogen, den der Eileiter beim Übergang in den Uterus am hinteren Leibesende macht." Fixation mit 70 proz. Alkohol, Sublimat-Essigsäure und Flemming'scher Lösung.

Oxyuris. Löwenthal nimmt wenige Stunden nach dem Tode der Kaninchen die Würmer aus Blind- und Grossdarm, reinigt sie in 0,7 proz. Kochsalzlösung und fixiert den isolierten Geschlechtsschlauch in 3—5 proz. Salpetersäure, 0,5 proz. Osmiumsäure oder Alkohol-Eisessig.

Oxyuris

Gordius. Zur Fixation der Eier: 3 proz. Salpetersäure oder eine Mischung von Alkohol und Essigsäure aa.

Gordius

Diplogaster longicauda. Man erhält sie, wenn man Regenwürmer mit Chloroform abtötet und in feuchter Gartenerde eine Zeit lang im Dunkeln aufbewahrt. Sie untersucht Ziegler mit Hilfe seines Durchströmungskompressoriums, erhält aber nur dann eine günstige Entwickelung, wenn frisches Brunnenwasser in reichlicher Menge durch den Apparat geleitet wird. Die frische Untersuchung ist nach ihm wegen der Kleinheit der Chromosomen und der Zellen vorteilhafter als die an konserviertem Material.

Diplogaster

Chaetognathen. Zur Fixation empfiehlt Lee Sublimat und die Altmann'sche Salpetersäure. Die Färbung lebender Zellen erfolgt mit Dahlia und Gentianaviolett nach la Valette St. George: Man stellt sich von diesen beiden Farben konz. wässerige Lösungen her und versetzt das die Zellen enthaltende Meerwasser mit einigen Tropfen derselben. Im übrigen siehe die Originalarbeit von Lee.

Chaetognatha

Acanthocephali. Bei Echinorhynchen wandte Kaiser die folgenden Fixierungsmittel an. Für den Hoden die Hermann'sche Flüssigkeit, bei welcher der Gehalt an 2 proz. Osmiumsäure 2 Volumina beträgt. Für andere Objekte

Acanthocephali

Echinorhynchus

1. 6 proz. mit Wasser hergestellte und auf 56—60 ° C. erwärmte Sublimatlösung. Darin bleiben Embryonen bis zu 3 mm Länge 5 Minuten, grössere 10—30 Minuten.

Das Sublimat wird dadurch entfernt, dass die Stücke für 2—6 Stunden in eine auf 58—60 ° erwärmte Lösung von Kampher in 60—70 proz. Alkohol kommen.

2. Quecksilberchlorid 10, Aq. dest. 300, Eisessig 3; für grössere Objekte; die Mischung, auf 40—45 ° erwärmt, wirkt 1 Stunde ein. Dann fliessendes Wasser 4 bis 8 Stunden.
3. Kaltgesättigte wässerige Lösung von essigsaurem Quecksilber unter Zusatz von einigen Tropfen reiner Essigsäure. Auswaschen in schwach angesäuertem 35 proz. Alkohol Für Embryonen und kleine Echinorhynchen.
4. Quecksilbercyanid in konz. wässeriger Lösung auf 45 ° erwärmt 15—60 Min. Auswaschen in 70 proz. Alkohol.
5. Folgende Pikrin-Chrom-Schwefelsäure:

Pikrinsäure, kryst.	1
Schwefelsäure, konz.	10
Chromsäure, kryst.	1
Aq. dest..	1000

Annelides
1. Untersuchungsmaterial
Myzostoma

Annelides. Beschaffung des Untersuchungsmaterials: Chaetopoda. Bei Myzostoma erhielt Beard sein Material dadurch, dass er eine grössere Anzahl M. im Seewasser zerdrückte. Dadurch fallen Eier und Samen in das Wasser und befruchten sich. Da die M. Hermaphroditen sind, muss man viel Material nehmen, um Selbstbefruchtung zu vermeiden. Häcker zerzupft möglichst grosse und dunkle Exemplare von M., Wheeler quetscht sie längs der Mittellinie des Rückens mit einer stumpfen Nadel und zwingt sie dadurch, Eier und Samenmasse zu entleeren. Zur Fixierung der kleinen Eier bedient sich Häcker eines Kunstgriffes. Aus Ulvablättern schneidet er sich kleine napfartige Vertiefungen heraus und bringt in diese die Eier in wenig Wasser mit Hilfe einer Pipette. Hierin lässt er sie sich weiter entwickeln, indem die Näpfe in tiefe Uhrschälchen gestellt werden. Zur Fixierung übergiesst er sie in dem Napf mit dem Fixationsmittel; die Eier kleben am Blatt fest und werden mit demselben durch die Alkohole gebracht und mit ihm zusammen eingebettet und geschnitten. Über die Züchtung von Nereis macht v. Wistinghausen erschöpfende Angaben. Als Aquarium dienten ihm flache Glasschalen, die zur Hälfte mit filtriertem Seewasser gefüllt wurden und Stücke von Ulva lact. enthielten; diese dienen

Nereis

einerseits zur Nahrung, andererseits zur Erzeugung von Sauerstoff. Von dem frisch gefangenen Materiale nimmt man diejenigen Weibchen, die strotzend mit Eiern gefüllt sind und bringt sie mit einer grossen Anzahl Männchen (dreimal soviel Männchen wie Weibchen) in das Aquarium. Das Weibchen baut sich bald eine Tube, die sie entweder an den Wänden des Gefässes oder zwischen den Algen anlegt und darin nach einigen Tagen die Eier ablegt, die dann vom Männchen befruchtet werden. Ist kein solches vorhanden, „so kriecht das Weibchen aus der Röhre und lässt die Eier auf den Boden des Gefässes oder auf Algen fallen; die so abgelegten Eier sind dann stets unbefruchtet und entwickeln sich nicht". Um der Tube Eier zu entnehmen, „macht man am geschlossenen Ende mit einer feinen Schere einen kleinen Einschnitt und saugt mit einer feinen gebogenen Glaspipette eine beliebige Anzahl Eier auf. Das Weibchen verklebt den Einschnitt wieder, um das Eindringen des Seewassers zu verhüten und die Embryonen vor direktem Kontakt mit dem Wasser zu schützen." Man muss bei der beschriebenen Manipulation sehr behutsam arbeiten, da das Weibchen nicht vertrieben werden darf, sonst entwickeln sich die Eier nicht weiter.

Capitella

In ähnlicher Weise verschafft Eisig sich das Untersuchungsmaterial von Capitella; er hebt noch als wichtig hervor, dass man die Stücke von Ulva, die man in die die Eiröhren enthaltenden Gefässe tut, vorher tüchtig in Seewasser abspülen und mit der Lupe nach etwa anhaftenden Tieren absuchen muss. Über das Alter der Eier orientiert man sich in der Weise, dass man die Wohnröhre von Sand reinigt, unter das Mikroskop legt und im Oberlicht die Eier untersucht. Die eben abgelegten Eier zeigen Polkörperbildung und 2- und 8-Teilung. Das Herauspräparieren geschieht durch einfaches Zerreissen der Röhre.

2. Männliche Geschlechtsorgane

Männliche Geschlechtsorgane. Vogt und Yung empfehlen zur Untersuchung der Samenflüssigkeit der Oligochaeten eine Verdünnung derselben mit dem Kronecker'schen Serum: Aq. dest. 1 Liter, kaustisches Natron 0,06 g, Meersalz 6 g. Zur

a) Isolation

Herstellung von Isolationspräparaten zerzupft Erlanger den Hoden (von Lumbricus) in Eiweisslösung, da sich die Zellen in physiologischer Kochsalzlösung nicht halten, legt ein Deckglas auf und verdrängt nun erst das Eiweiss durch physiologische Kochsalzlösung. Danach bringt er unter das Deckglas eine mit Dahlia

gefärbte physiologische Kochsalzlösung. Als Mazerationsgemisch dient ihm die Hertwig'sche Osmium-Essigsäure oder 1 proz. Essigsäure. Calkins nimmt die Zerzupfung der Samenblase geschlechtsreifer Tiere in Hermann'scher Flüssigkeit vor. Nach 10 Minuten wäscht er in Aq. dest. und ersetzt dieses durch allmählich verstärkten Alkohol. Aus letzterem kommen die isolierten Elemente vermittels Pipette auf einen mit Eiweiss-Glyzerin bestrichenen Objektträger, wo die Zellen schnell antrocknen und gefärbt werden können. Pictet zerzupft die Hoden und untersucht die isolierten Elemente in einer Lösung von Dahlia in Meerwasser, in 5—10 proz. wässeriger Lösung von Manganchlorür + einige Tropfen einer konzentrierten wässerigen Dahlialösung oder in Lösung von Methylgrün in Essigsäure.

b) Untersuchungsmaterial

Wahl des Materiales. Erlanger empfiehlt zur Untersuchung der Hoden statt Lumbricus Allobophora, weil hier die Hoden frei in der Bauchhöhle liegen und leicht abzupräparieren sind, während sie bei Lumbricus von der Bergh'schen medialen Samenkapsel bedeckt werden.

c) Streckung der Würmer

Streckung der Würmer. Nach Erlanger durch Übergiessen von Wasser, das mit 70 proz. Alkohol versetzt ist. Nach Jaquet durch Einlegen in konzentrierte Salpetersäure 4, Wasser 500 auf 5 Minuten.

d) Fixation

Zum Fixieren der Hoden schneidet man die gestreckten Würmer unter physiologischer Kochsalzlösung auf und giesst die Fixierungsflüssigkeit darüber; als solche kann Pikrin-Essigsäure, Sublimat, Perényi'sche, Flemming'sche und Hermann'sche Flüssigkeit dienen.

3. Entwickelungsstadien Myzostoma

Entwickelungsstadien. Chaetopoda. Postlarvale Stadien von Myzostoma fixiert Beard in Seewasser, das 10 % Alkohol enthält. In dieser Mischung erhöht er nach und nach den Gehalt an Alkohol, sodass die Objekte ganz allmählich in 95 proz. Alkohol kommen. Wheeler färbt die ganzen Eier von Myzostoma mit Essigkarmin nach Schneider; die Fixation nimmt er mit Flemming-scher Lösung in der Weise vor, dass er die Eier in wenig Seewasser in ein Uhrschälchen bringt und das Fixierungsmittel dazu giesst. Die Eier kleben am Glas fest und man kann nun alle weiteren Prozeduren (Auswaschen, Einbetten) in demselben Uhrglase vor-

nehmen. Vergleiche hierzu Häcker, der, wie oben[1]) erwähnt, Ulvanäpfchen nimmt. Sein Fixierungsmittel ist die Platinchlorid-Osmium-Pikrin-Essigsäure (vom Rath); Kostanecki empfiehlt zur Fixation das Gemisch von Perényi.

Nereis

Um gute Oberflächenpräparate von Nereis zu erhalten, verfährt v. Wistinghausen folgendermafsen: Er konserviert die Eier entweder mit der nach seinen Angaben hergestellten Kleinenberg'schen Pikrin-Schwefelsäure oder mit einer Sublimat-Eisessigmischung. In der Kleinenberg'schen Flüssigkeit bleiben die Eier $1^1/_2$—2 Stunden, kommen dann auf 2 Tage in häufig gewechselten 70 proz. Alkohol und werden schliesslich in 90 proz. Alkohol aufbewahrt. Die Sublimat-Eisessigmischung besteht aus: konz. Sublimatlösung 100, dest. Wasser 100, Eisessig 5. Diese wird auf 40° C. erwärmt; darin verweilen die Eier 5 Minuten, kommen dann in 50 proz. Alkohol auf 2 Stunden und in 70 proz. Alkohol. Zur Färbung der Oberflächenpräparate kann man nur Kleinenberg'sche alkoholische Hämatoxylinlösung verwenden. Alkoholischer Boraxkarmin färbt die Dottermassen zu stark mit, schwach alkoholische und wässerige Farbstofflösungen wirken quellend. Das Verfahren der Färbung ist folgendes:

1. alkoholische Hämatoxylinlösung 2 Stunden,
2. Entfärbung in schwach angesäuertem Alkohol,
3. 70 proz. Alkohol mit einigen Tropfen einer Lösung von Natron bicarbonic. in 70 proz. Alkohol (man löst das Salz in dem heissen Alkohol und filtriert nach dem Erkalten).
4. 95 proz. Alkohol.

Grössere Embryonen werden nach Wistinghausen am besten in einer modifizierten Fol-Flemming'schen Lösung fixiert, welche die histologischen Strukturen vorzüglich erhalten soll. Sie besteht aus:

1 proz. Osmiumsäure . .	1—1,5 ccm
1 proz. Chromsäure	25 „
2 proz. Essigsäure	5 „
Wasser	70 „

[1]) Seite 98.

darin bleiben die Objekte 1 Stunde; dann Auswaschen in fliessendem Wasser 24 Stunden, 50 proz. Alkohol 3 Stunden. Aufbewahren in 70 proz. Alkohol. Wilson empfiehlt 3 Methoden für Nereis:

1. Zur Untersuchung der Eier in toto: Fixation in Glyzerin, Wasser, Essigsäure aa. Färbung mit Essigkarmin (Schneider) 3—5 Minuten. Auswaschen in dem Glyzerin-Wasser-Eisessiggemisch.
2. Für Schnittpräparate: Fixation mit dem Gemisch von Flemming und Perényi 10—30 Minuten oder mit der Lang'schen Flüssigkeit.
3. Färbung der lebenden Embryonen durch Zusatz von Methylenblau zum Seewasser.

Polynoe
Polygordius
Tomopterix

Bei Polynoe-, Polygordius- und Tomopterix-Larven wandte Häcker zur Fixierung Platinchlorid-Pikrinsäure und Platinchlorid-Chromosmium-Essigsäure an. Die Dauer der Einwirkung der genannten Mittel betrug 10—15 Minuten. Child fixierte die Eier von Arenicola und Sternapsis in Pikrin-Essigsäure, ebenso Mead diejenigen von Chaetopterus zum Studium der Centrosomen. Zum Fixieren der jüngeren und zum Teil auch der älteren Stadien von Capitella empfiehlt Eisig das Lang'sche Sublimatgemisch in folgender Zusammensetzung: Mit Seewasser hergestellte 5 proz. Sublimatlösung 3 Teile, Eisessig 1 Teil. Diese Mischung wird kalt über die in einer Uhrschale in wenig Seewasser befindlichen Eier gegossen und wirkt eine halbe Stunde lang ein. Hierbei müssen die Eier und ebenso auch die Larven in der Flüssigkeit flottieren. Ältere Larven mit Muskulatur kokaïnisiere man vor der Fixation mit einer 2 proz. Kokaïnlösung in Seewasser, von der man einige Tropfen dem die Larven enthaltenden Seewasser zufügt. Aus dem Fixationsgemisch kommt das Material in die Alkoholreihe, vom 50 proz. Alkohol bis zum 90 proz. Alkohol. Zur Färbung diente das Mayer'sche alkoholische Hämacalcium mit einem Eisessiggehalt bis zu 5 %. Jüngere Eier bleiben längere, ältere kürzere Zeit in der Farbe, sodass die Färbungsdauer zwischen 1 und 5 Min. variiert. Danach kommen sie in 70 proz. Alkohol, dann die Nacht über in 70 proz. Alkohol, der 2 % Aluminiumnitrat enthält, dann durch 70 proz. Alkohol in 90 proz.

Arenicola
Chaetopterus
Capitella

Ophryotrocha

Ophryotrocha[1]). Die Eier fixiert Korschelt in Pikrin-Essigsäure (Boveri) auf 3—4 Stunden; dann Alkohol. Lopadorhynchus[1]) behandelt Kleinenberg mit Pikrin-Schwefelsäure, aus der das Material sofort in Alkohol kommt, Meyer mit dem Lo Bianco'schen Gemisch von Kupfersulfat und Sublimat (10 proz. Kupfersulfat 10, konz. Sublimat 1) oder mit Sublimat oder Pikrinsäure + Essigsäure (auf 3 Teile der gesättigten Lösung 1 Teil).

Lopadorhynchus

Tubifex. (Clepsine)

Bei Tubifex (und Clepsine) fixiert Gathy mit der Gilson-schen Sublimatlösung auf 15 Minuten, wäscht dann mit Wasser $1/4$ Stunde lang aus und hebt schliesslich das Material in 90 proz. Alkohol auf. Apáthy verwendet für Clepsine folgende Methoden:

1. konz. wässerige Sublimatlösung, konz. wässerige Pikrinsäure, 15 proz. Essigsäure aa für 12—14 Stunden; dann Alkohol.
2. Sublimat, in 0,5 proz. Kochsalzlösung gesättigt, und 1 proz. Osmiumsäure aa,
3. für Oberflächenbilder a) abs. Alkohol 3, Eisessig 1, oder b) ges. wässerige Sublimatlösung mit 20 % Eisessig. In beiden Fällen nach $1/4$ Stunde Übertragung in alkoholische Sublimatlösung; dann Alkohol,
4. für ältere Embryonen: Sublimatlösung mit ein wenig 1 ‰ Osmiumsäure.

Lumbricus

Bergh fixiert bei Lumbricus auf einige Minuten mit Flemming'scher Chrom-Osmium-Essigsäure und danach während einer 2—3 mal so langen Dauer mit $1/3$ proz. Platinchlorid. Zur Untersuchung der Wilson'schen Streifen wendet er das Ranvier-sche Verfahren an. Die Embryonen kommen in frisch ausgepressten und durch Flanell filtrierten Zitronensaft auf 5 Minuten, dann auf 20 Minuten in eine 1 proz. Goldchloridlösung. Die Reduktion findet bei Tageslicht mit Hilfe einer mit Wasser verdünnten Ameisensäure statt. Dauer der Reduktion 1—2 Stunden. Die Ameisensäure enthält auf einen Teil 4 Teile Wasser.

Gephyrei (Thalassema Zirphaea)

Gephyrei. Thalassema und Zirphaea. Fixierung der Eier am besten mit Pikrinessigsäure (1—2 % Essigsäurezusatz), ferner mit Sublimat, das 3, 10 oder 20 % Essigsäure enthält. Reines Sublimat ist für Z. vollkommen unbrauchbar (Griffin).

[1]) Vergl. Lee u. Mayer, Grundzüge 1901, p. 319.

Rotatoria

Rotatoria. Beschaffung des Untersuchungsmaterials. Für Callidina schüttelt Zelinka in Wasser aufgeweichtes Dachmoos aus, untersucht den Detritus, sucht die der Eireife nahestehenden Callidinen heraus und züchtet sie in Glasschalen bei häufigem Wasserwechsel.

Abtötung

Die Abtötung der Tiere bei Hydatina nimmt Lenssen in der Weise vor, dass er auf die in einem hohlen Objektträger mit möglichst wenig Wasser isolierten Tiere eine mit Essigsäure versetzte und fast zum Sieden erhitzte Sublimatlösung träufelt. Dann wird sofort mit reinem Wasser ausgewaschen. Zur Fixierung der Eier genügt es, dieselbe Sublimatlösung kalt anzuwenden. Jennings rühmt zur Fixation der trächtigen Weibchen der Rotatoria das starke Gemisch von Flemming; bei diesem Verfahren müssen die Eier aber mit Kaliumchlorat und Salzsäure gebleicht werden. Hierüber vergleiche Lee und Mayer S. 289: „Man legt in einen Glastubus einige Krystalle von Kaliumchlorat, gibt 2—3 Tropfen Salzsäure darauf und giesst, wenn sich das grüngelbe Chlor zu entwickeln beginnt, einige ccm Alkohol von 50—70 % hinzu. Nun bringt man die Objekte, die bis dahin in Alkohol von 70—90 % gewesen sind, in den Tubus, worin sie zunächst schwimmen, später aber untersinken. Sie bleichen je nach Umständen in 1/4 Stunde bis 1 oder 2 Tagen, ohne histologisch zu leiden."

Fixation

Literatur zu Kapitel 5

F. v. Wagner, Zool. Jahrb., Abtlg. Anat. Bd. 4, 1890. — Repiachoff, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 56, 1893. — van der Stricht, Arch. Biol. Bd. 15. — Francotte, Arch. Zool. expér. et gén. (3) T. 6, 1898. — Klinkowström, Arch. mikrosk. Anat. Bd. 48. — Biehringer, Arb. a. d. zool. zoot. Instituts Würzburg Bd. 7, 1884. — Goldschmidt, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 71, 1902. — Grassi und Rovelli, ref. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 9. — van Beneden (Taenia-Embryonen), cit. nach Lee u. Mayer, Grundzüge, p. 322. — Coe, Zool. Jahrb., Abtlg. Anat. Bd. 12, 1899. — Lee, Recueil zool. suisse T 4, 1888, La cellule T. 4, 1888. — Boveri, Festschr. f. Kupffer, Jena 1899; Sitz.-Ber. Ges. Morph. u. Physiol. München, Bd. 3, 1887; Jen. Zeitschr. 21. 22, 35. — van Beneden, Bull. Akad. R. Brux. Sér. 3, T. 14. 1887; Arch. Biol. T. 4, 1883.

Bataillon, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 11, 1901. — Nussbaum, Arch. mikrosk. Anat. Bd, 23, 1884; Arch. mikrosk. Anat. Bd. 26, 1886; Arch. mikrosk. Anat. Bd. 59.

Munk, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 9, 1858. — Kultschitzky, Arch. mikr. Anat. Bd. 31. — Zoja, Arch. mikr. Anat. Bd. 47, 1896, und cit. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 11.

Zacharias, Arch. mikr. Anat. Bd. 30, 1887, und Anat. Anzeig. Bd. 3, 1888. — Brauer, Arch. mikr. Anat. Bd. 42, 1893. — Platner, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 4. — van Gehuchten, Anat. Anzeig. Bd. 3, 1888. — Carnoy, La cellule T. 2 u. 3, 1886/87. — Carnoy u. Lebrun, La cellule T. 13. — van Beneden u. Neyt, Bull. Akad. Belg. Sér. 3, T. 14. — Lukjanow, Arch. mikr. Anat. Bd. 34, 1889. — v. Wasielewski, Arch. mikr. Anat. Bd. 41. — Herla, Arch. Biol. T. 13. — zur Strassen, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 3. — v. Erlanger, Arch. mikr. Anat. Bd. 49/47. — Sabaschnikoff, ref. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 15. — Kostanecki u. Siedlecki, Arch. mikr. Anat. Bd. 48. — V. Häcker, „Praxis und Theorie“ etc. Jena, 1899, p. 62. — Fürst, Arch. mikr. Anat. Bd. 52. — Moszkowski, Arch. mikr. Anat. Bd. 59. — Bonnevie, Jen. Zeitschr. f. Naturw. Bd. 36. — Löwenthal, Intern. Monatsschr. Anat. Physiol. Bd. 6, 1889. — Spemann, Zool. Jahrb. Abtlg. Anat. Bd. 8. — O. Meyer, Jen. Zeitschr. f. Naturw. Bd. 29, 1895. — Camerano, ref. nach Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. 8. — H. E. Ziegler, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 60, 1895. — Kaiser, Biblioth. zool. H. 7, 1891. — Beard, Mitt. Zool. Stat. Neapel Bd. 5, 1884. — Wheeler, Arch. Biol. Bd. 15 (cit. nach Val. Häcker, „Praxis u. Theorie“ etc. Jena 1899). — v. Wistinghausen, Mitt. Zool. Stat. Neapel Bd. 10, 1881. — Eisig, Mitt. Zool. Stat. Neapel Bd. 13, 1898. — Vogt und Yung, Lehrb. d. vergl. Anat. 1888, p. 478. — Calkins, Journ. of Morphol. Bd. 11, 1895. — Jaquet, Bibliogr. anat. Bd. 3, 1895. — Pictet, Mitt. Zool. Stat. Neapel Bd. 10.

Kostanecki, Arch. mikr. Anat. Bd. 51, 1898. — Wilson, Journ. Morph. Boston vol. 6, 1892 (cit. nach Lee u. Mayer, Grundzüge, p. 319). — Child, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 9, 1900, — Mead, Journ. of Morph. vol. 12, 1896. — Korschelt (für Ophryotrocha). cit. nach Lee u. Mayer, Grundzüge, p. 319. — Gathy, La cellule T. 17, 1900. — Apáthy (Carazzi, Manuale, p. 214), cit. nach Lee u. Mayer, Grundzüge, p. 320. — Bergh, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 50, 1890. — Griffin, Journ. of Morphol. Bd. 15, 1899. — Zelinka, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 53, 1892. — Lenssen. La cellule T. 14. — Jennings, cit. nach Lee u. Mayer, Grundzüge, p. 320.

Kapitel 6

Arthropoda[1])

Weibl. Geschlechtsorgane

Frische Untersuchung

Fixation

Weibliche Geschlechtsorgane. Frisches Material untersuchen Korschelt und Häcker (Dytiscus, Carabus, Bombus, Apis) in 0,75 proz. Kochsalzlösung; La Valette St. George in Dahlia und Methylserum, Koujawski in der Leibesflüssigkeit. Zur Fixation bedient sich Korschelt der konz. Sublimatlösung und der Chrom-Osmium-Essigsäure. Ersteres Mittel wendet er an zur Erhaltung der Pseudopodien des Keimbläschens, letzteres zum Nachweis der von aussen in das Ei getretenen Substanzen. Die Chrom-Osmium-Essigsäure wirkt 15—20 Minuten ein; dann wird abgespült und die Osmiumsäure durch 15—30 Minuten langes Einlegen in Methylalkohol reduziert. Zum Studium des Dotterkerns eignet sich nach Häcker das Ovarium der Hausspinne. Man untersucht im frischen Zustande in physiologischer Kochsalzlösung, im Spinnenblute oder in dem Frey'schen Ersatz für Jodserum; das letztere fertigt man sich in folgender Weise an: „Zu einem ganzen Hühnereiweiss wird im Verhältnis von 30 : 2,5 Kochsalz- und im Verhältnis von 30 : 270 Teilen destilliertes Wasser zugesetzt, welchem vorher zur Erhöhung der Dauerhaftigkeit (etwa 3 Wochen) auf je 250 g etwa 10 g Aq. amygdalarum amararum (= 0,01 HCN) zugefügt wurde. Man rührt um und filtriert durch einen Bausch Filtrierwatte (Schütz).“[2])

Dotterkern

Fixierungsmittel (weibl. Geschlechtsorgane)

Weitere Fixierungsmittel sind:

1. Kleinenberg'sche Flüssigkeit (Copepoden),
2. Gilson'sche Lösung (Myriapoden),
3. Platinchlorid-Pikrin-Essigsäure vom Rath (Hexapoda),

[1]) Über die Methoden von Hammar zur Darstellung der Verbindungen zwischen den Blastomeren siehe Seite 79.

[2]) Häcker, Praxis u. Theorie, Jena 1899, p. 119.

4. Heisses Wasser (Hexapoda),
5. Weingelbe Lösung von Chromsäure (Hexapoda),
6. Heisser Sublimat-Alkohol,
7. Alkohol-Sublimat-Eisessig (Apis; um hierbei ein rascheres Eindringen zu ermöglichen, trennte Paulcke vor der Fixation den Thorax vom Abdomen und entfernte vorsichtig den ersten Hinterleibsring),
8. Flüssigkeit von Merkel (Xiphosura),
9. Chromessigsäure nach Koujawski (acid. chrom. $^1/_4$ % 100, Eisessig 1). (Gross aber warnt vor der Anwendung jeglicher Chromessigsäuremischung für das Ovarium der Insekten).
10. Flemming'sche Lösung (diese empfiehlt Gross warm).

Ovarialeier

Ovarialeier. Fixation. Auspräparieren unter physiologischer Kochsalzlösung; Einlegen in Perényi'sche Flüssigkeit für 15 Minuten. Dann 70 proz. Alkohol. Ausser dem genannten Fixativ ist auch konz. wässerige Sublimatlösung brauchbar.

Männl. Geschlechtsorgane Präparation d. Spermatozoen

Männliche Geschlechtsorgane. Über die Herausnahme der Spermatozoen machen G. Herrmann und G. Gilson die folgenden Angaben: Herrmann sticht die Hodenbläschen der Thoracostraca an und entleert ihren Inhalt in das Blutserum des getöteten Tieres. Gilson schneidet das Tier trocken auf und nimmt den Hoden ganz heraus; dieser wird dann auf einen trocknen Objektträger gelegt und in Stücke zerschnitten und aus jedem derselben die Flüssigkeit vorsichtig herausgedrückt. Verteilen derselben mit einer Nadel; vor dem Verdunsten schützt man sie durch Anhauchen. Während G. dieses Verfahren bei den Myriapoden, speziell Lithobius anwandte, verfährt er bei der Untersuchung der Crustacea in anderer Weise. Hier ist der männliche Geschlechtsapparat bilateral; es befinden sich jederseits drei blind endende Schläuche, die in einen gemeinsamen ausgeweiteten Gang ausmünden. Die ersten Stadien der Spermatogenese spielen sich in diesen Schläuchen ab; der gemeinsame Verbindungsgang schliesst fertig gebildete oder wenigstens dem Ende ihrer Entwickelung nahestehende Samenelemente ein. Die blind endenden Schläuche sind eng und von einer sehr festen Membran umschlossen; sie enthalten in Bildung begriffene Samenelemente. Man kann ihren Inhalt durch

Lithobius

Crustacea



Zerschneiden leicht entleeren. Man bringt das Tier lebend auf den Objektträger in einem grossen Tropfen folgender Flüssigkeiten, die einander gleichwertig sind:

1. Methylgrünlösung,
2. Flüssigkeit von Ripart und Petit,
3. gesättigte Lösung von essigsaurem Uran unter Zusatz von Methylgrün.

Man trennt nun mit einem Skalpel die Membran, die den siebenten mit dem sechsten Ring verbindet. Hierdurch wird der Körper in zwei Teile zerschnitten; der hintere enthält die beiden männlichen Geschlechtsapparate, die dem Intestinaltraktus dicht anliegen. Man legt nun die isolierten Geschlechtsschläuche in die Mitte des Objektträgers, entfernt die Überreste des Tieres und auch den grössten Teil der verwendeten Flüssigkeit, von der man nur soviel zurücklässt, als nötig ist, um das Glas in der Umgebung der Schläuche feucht zu erhalten. Durch leichtes Streichen entleert man den Inhalt der Schläuche und kann nunmehr das austretende Sperma leicht verteilen. Das ist nicht der Fall, wenn man ein grösseres Quantum der den Objektträger ursprünglich bedeckenden Flüssigkeit zurücklässt; dann würde sich das Sperma in demselben koagulieren (Gilson).

Frische Untersuchung d. Spermatozoen

Die Untersuchung der frischen Präparate nimmt K. Ballowitz in 0,6—0,7 proz. Kochsalzlösung vor.

Flimmerung lebender Spermatozoen. Sie wird durch Wärme verstärkt und nimmt von 20—30° C. zu. Das Wärmeoptimum ist: 30–35° C. bei Chrysomela, Otiorrhynchus, Lina, Hydrophilus, Carabus u. a. Wärmestarre und Absterben tritt ein bei 40—50° C. (E. Ballowitz).

Fixation d. Spermatozoen

Fixation der Spermatozoen. Mit Osmiumsäure. Auf die mit Kochsalzlösung verdünnte, im hängenden Tropfen befindliche Samenflüssigkeit lässt man die Dämpfe einer 1 proz. Osmiumsäure 5 Minuten lang einwirken; die so fixierten Spermatozoen können in Glyzerin aufgehoben werden. Untersucht werden sie in Wasser oder Kochsalzlösung. Eine andere Methode ist die folgende. Dem mit Kochsalzlösung verdünnten Sperma wird in sogenannten Brunnengläschen ein gleiches Quantum 1 proz. Osmiumsäure zugesetzt. Auf diese Weise kann man die Spermatozoen längere Zeit aufheben (K. Ballowitz).

G. Herrmann stellt sich durch Auflösen von 1 g Osmiumsäure in 25 g Wasser eine konz. Lösung derselben her und fixiert die Spermatozoen der Thoracostraca mit den Dämpfen dieser Lösung für 20—30 Sekunden. Zur Färbung versetzt er vor der Fixierung die die Samenelemente enthaltende Flüssigkeit mit einer geringen Quantität schwach saurer wässeriger Methylviolettlösung. Ebenso verfährt Gilson bei den Myriapoden; oder er vermischt die auf dem Objektträger befindliche Samenflüssigkeit mit einem Tropfen folgender Lösung: Flüssigkeit von Ripart und Petit 5 Teile, Osmiumsäure (2 auf 1000) 1 Teil. Zur gleichzeitigen Fixierung und Färbung kann dieser letzten Flüssigkeit ein Tropfen angesäuerter Methylgrünlösung zugefügt werden.

Thoracostraca

Myriapoda

Trockenpräparate und Färbung. Als Färbemittel kommen in Betracht:

Trocken-präparate d. Spermatozoen

1. Alaunkarmin nach Grenacher,
2. Hämatoxylin.

Man lässt das ausgestrichene Sperma an der Luft trocknen, zieht dann das Deckglas schnell durch die Spiritusflamme und legt es mit der bestrichenen Seite auf die Farbe. Dann Abspülen in Wasser; Lufttrockenmachen, flüchtiges Erwärmen, Canadabalsam.[1])

Mazerationspräparate der Spermatozoen. Folgende zwei Methoden sind anwendbar:

Mazerations-präparate d. Spermatozoen

1. als Mazerationsflüssigkeit dient 0,6—3 proz. Kochsalzlösung. Das Sperma wird mit einer dieser Lösungen verdünnt und davon 1 Tropfen auf den Objektträger gebracht. Nun Auflegen eines Deckglases, das mit einem Wachsring umgeben wird. Nach 12—24 Stunden ist die Mazeration eingetreten; nun wird der Wachsring an zwei Seiten entfernt und das Material unter dem Deckglase mit 0,5—1 proz. Lösungen von Gentianaviolett oder Methylviolett gefärbt (K. Ballowitz).
2. Diese Methode ist nur bei grösseren Tieren zu verwenden, deren Vasa def. stark gefüllt sind und so dicke Wandungen besitzen, dass sie nicht selbst mit mazeriert werden (so bei Hydrophilus, Calathus). Nach Tötung

[1]) Nach K. Ballowitz müssen die Samenkörper vor dem Eintrocknen in der vorher beschriebenen Weise mit Osmiumsäure fixiert sein.

des Tieres beseitigt man die Flügel und die obere Abdominalwand und legt den Körper so in 0,8 proz. Kochsalzlösung, dass die Eingeweide gerade bedeckt werden. Nach einigen Tagen, während welcher man die Kochsalzlösung öfter erneuert, präpariert man das Vas. def. aus und zerzupft es; die Spermatozoen bleiben dann noch 1—2 Tage in der Kochsalzlösung liegen. Dann Färben.

Hoden (Isolationspräparate)

Isolationsapparate des Hodens. v. La Valette St. George verwendet zur Untersuchung Dahlia und Methylserum oder mit Dahlia verriebenes und abfiltriertes Jodserum (Seidenspinner und Hausschabe). Die isolierten Elemente fixiert Tönniges bei den Myriapoden für 2 Minuten und färbt sie mit der Ripart-Petit'schen Methylgrünlösung. Prenant isoliert bei den gleichen Objekten mit Osmiumsäure (1 : 100) oder mit der mit Osmiumsäure versetzten Flüssigkeit von Ripart-Petit, ferner mit Salpetersäure (3 : 100). Die Färbung nimmt er in essigsaurer Methylgrünlösung vor. Gilson bedient sich zur Trennung und Färbung der Hodenzellen folgender Mischung:

„NaCl sol. à $^{10}/_0$ aq. dist. . . . . 1 Vol.
Sol. très acide de vert de méthyle . 1 Vol."

Er untersucht die Präparate in der Flüssigkeit von Ripart und Petit. Eine andere von Gilson angewandte Methode besteht darin, dass der Hoden in einen grossen Tropfen Methylgrünlösung auf den Objektträger gebracht und so lange den Dämpfen einer alkoholischen Lösung von Schwefligsäureanhydrid ausgesetzt wird, bis das Methylgrün entfärbt ist. Dann wird isoliert. Carnoy isoliert zuerst die Zellen des dem lebenden Tiere entnommenen Hodens durch vorsichtiges Streichen der zerschnittenen Hodenstücke. Dann werden sie nur 2—3 Sekunden (so lange, als man bis 20 zählt) den Dämpfen der schwefligen Säure ausgesetzt, sorgfältig gewaschen und mit Methylgrün gefärbt. Henking zerzupft den Hoden in folgender Mischung:

Aq. dest.	80 ccm
Glyzerin	16 „
Ameisensäure	3 „
1 proz. Osmiumsäure . .	1 „
Dahlia	0,04 g

und hebt die isolierten Elemente hierin auf.

Hoden (Fixationsmittel)

Fixationsmittel des Hodens.

1. Müller'sche Flüssigkeit (Rhynchota),
2. Heisses Wasser (Rhynchota, Ostracoda),
3. Sublimat (Rhynchota, Ostracoda),
4. Flemming'sche Flüssigkeit (Rhynchota, Orthoptera, Myriapoden), Fixationsdauer 1 Stunde,
5. Flemming'sche Flüssigkeit, um das gleiche Volumen mit 1 proz. wässeriger Chromsäure verdünnt (Myriapoden),
6. Pikrin-Schwefelsäure nach Kleinenberg (Lepidoptera),
7. Sublimatlösung nach Gilson (Orthoptera),
8. Hermann'sche Flüssigkeit (Myriapoden, man lässt die Fixierungsflüssigkeit erst eine kurze Zeit auf den ganzen Hoden einwirken, zerschneidet dann denselben und fixiert weiter; Fixationsdauer im ganzen 2 Stunden, dann Alkohol; vergl. Tönniges),
9. Pikrin-Osmium-Essigsäure nach vom Rath (Marine Copepoden: Fixationsdauer 1 Stunde); (ebenso auch für Decapoden),
10. Pikrin-Essig-Sublimat nach vom Rath, Fixationsdauer 1 Stunde (Marine Copepoden),
11. Platinchlorid-Pikrin-Osmium-Essigsäure nach vom Rath, Fixationsdauer 1 Stunde (Marine Copepoden),
12. Formol-Pikrin-Essigsäure nach Bouin (Myriapoden). Fixationsdauer 24—48 Stunden, dann Wasser 4—5 Std., Alkohol,
13. Salpetersäure (3 : 100),
14. Flüssigkeit von Ripart und Petit 5, Osmiumsäure (2 : 1000) 1; letztere beiden für Myriapoden, Fixationsdauer 1 Stunde,
15. Pikrin-Salpetersäure (Ostracoda),
16. Sublimat-Eisessig (Eisessiggehalt 5 %) für Pentatomidae,
17. 1 proz. Chromsäure . . . . 12—15 ccm
Eisessig . . . . 1—2 Tropfen
konz. Osmiumsäure . . . . 8—10 „
Herrmann für Thoracostraka (über die konz. Osmiumsäure siehe oben S. 109); Dauer der Fixation 5 Stunden, dann Wasser, Alkohol,

18.[1] „HNO_3 à 46 Bé . . . . 3 Vol.
$C_2H_4O_2$ $^{15}{}_{.85}$ H_2O . . . . 3 „
$HgCl_2$ sol. sat. aq. dist. . . . . . . 31 „
Alcool 60° . . . . 10 „
H_2O . . . . 53 „"
nach Gilson. Dauer der Fixation 10—15 Minuten. Die Menge dieser Mischung, die angewendet wird, ist 30 ccm. Zu dieser das Material enthaltenden Flüssigkeit giesst man nach beendeter Fixation das gleiche Quantum (30 ccm) Alkohol 90°. Nach 10 Minuten kommen die Stücke in reinen Alkohol von 90°.

19. Fixation mit Schwefeligsäureanhydrid und Sublimat nach Gilson. Man stellt sich eine Lösung von Schwefeligsäureanhydrid dadurch her, dass man einen Strom von SO_2-Dämpfen durch abs. Alkohol hindurchleitet. In die Dämpfe dieses so präparierten Alkohols, den man vorsichtig kocht, oder in die alkoholische Lösung selbst bringt man die zu fixirenden Stücke auf 2—10 Minuten; darauf kommen sie in die Gilson'sche Sublimatlösung.

20. Eisessig-Sublimat nach Carnoy, Eisessiggehalt 1%. Dauer der Fixation 6—10 Minuten; dann Aq. dest. einige Minuten, 60proz. und 90proz. Alkohol.

Färbung der Präparate des Hodens nach Gram

Einige besondere Methoden. Färbung nach der von Bizzozero abgeänderten Gram'schen Methode (Wilcox bei Rhynchota): a) Stückfärbung in Safranin 24 Stunden; b) Färben der Schnitte in Gentianaviolett 5 Minuten, Jodjodkalilösung, Alkohol, 0,1proz. Chromsäure kurze Zeit, dann Alkohol, Xylol, Balsam.

mit Safranin-Viktoriagrün

Färbung mit Safranin-Viktoriagrün (Wilcox bei Rhynchota): Färbung der Schnitte in Safranin 10—15 Minuten, dann 90proz. Alkohol kurze Zeit, starke Lösung von Viktoriagrün in abs. Alkohol 1—2 Minuten und abs. Alkohol für kurze Zeit.

mit Eisenhämatoxylin

Färbung mit Eisenhämatoxylin (Heidenhain): 1. 2proz. wässrige Lösung von Eisenalaun 1/2—1 Stunde; 0,5proz. wässrige Hämatoxylinlösung 1—2 Stunden; 4proz. wässrige Lösung von Eisenalaun 20 Minuten; 2. 2proz. wässrige Lösung von Eisenalaun 2 Stunden; 0,5proz. wässrige Hämatoxylinlösung 10—12 Stunden,

[1]) Vergl. Salpetersäure-Sublimat-Eisessig (Gilson) Seite 8

4proz. wässrige Lösung von Eisenalaun 2—8 Stunden. Nach jeder Operation gutes Auswaschen in Wasser (Wilcox für Rhynchota)

Totalpräparate des männl. Geschlechtsapparates

Herstellung von Totalpräparaten des männlichen Sexualapparates. Gilson verfährt dazu auf zwei Weisen: Die Organe werden trocken herauspräpariert, durch Alkoholdämpfe oder durch die Dämpfe der alkoholischen Lösung des Schwefeligsäureanhydrids fixiert und dann entweder in

60proz. Alkohol	60 ccm
Aq. dest.	30 „
Glycerin	30 „
15proz. wässrige Essigsäure	2 „
Sublimat korros.	0,15 gr

oder in

Glycerin	50 ccm
Wasser	50 „
Eisessig	10 „
Benzoes. Natron	20 ctg

conserviert.

Einige Fortpflanzungsverhältnisse

Crustacea

Cyclops

Fortpflanzung. Crustacea. Über die Fortpflanzung und die Gewinnung des Untersuchungsmateriales von Cyclops, dessen Eier Häcker für bestimmte Fragen der Embryologie, wie die Centralkörper- und Richtungskörperbildung und die Genitalzellen-Differenzierung empfiehlt, macht dieser Forscher die folgenden Angaben[1]:

„Für die meisten Zwecke eignen sich besonders die grösseren Tümpelformen, Cyclops viridis Jurine (brevicornis Claus), namentlich die bis zu 5 mm grosse Varietät C. gigas Claus, ferner signatus Koch und tenuicornis Claus. Aber auch die Eier der kleinen Tümpelform C. agilis Koch und des auch pelagisch auftretenden C. strenuus Fisch. liefern, namentlich was die Sphären und Dotterstrahlungen anbelangt, sehr schöne und instruktive Bilder.

„Alle Formen sind fast das ganze Jahr hindurch, solange die Gewässer offen sind, zu erhalten. In gewissen Perioden treten sie in grosser Menge auf.

„Um die frühesten Stadien der Eier (Richtungskörperbildung, Befruchtung, erste Furchungsstadien) zu erhalten, verfährt man bei den grösseren Arten in folgender Weise:

[1]) Häcker, Praxis u. Theorie etc., Jena 1899, p. 81.

„Ist das vorhandene Material ein sehr reichliches, so sucht man die Weibchen mit sehr dunklen Eisäcken heraus. Die Mehrzahl derselben wird die frühesten Stadien zeigen.

„Hat man mit dem Material etwas sparsamer umzugehen, so separiert man grosse, eiersacklose Weibchen in einem besonderen Aquarium, am besten in einer weissen Porzellanschale, in welche man einige Spirogyrafäden, ein paar Blätter zum Unterschlupf und einen Bodensatz von Pflanzendetritus bringt. Die Überführung aus dem Stamm-Aquarium in das besondere Aquarium erfolgt am besten mittelst eines Uhrgläschens, da man auf diese Weise auch die kleinen Männchen mitbekommt. Da nun, wenigstens bei Cyclops viridis, die Bildung der Eisäcke zu allen Tages- und Nachtzeiten erfolgt, so wird man, wenn man das Porzellan-Aquarium täglich mehrere Male revidiert, stets auf eine Anzahl ganz junger Stadien stossen.

„Um ein bestimmtes Furchungsstadium zu erhalten, ist es zweckmässig, Weibchen mit ganz jungen Eisäcken, welche auf die eben erwähnte Weise gewonnen wurden, in Uhrschälchen abzusondern und von Zeit zu Zeit mit schwacher Vergrösserung, nach jedesmaliger Absaugung des Wassers und ohne Anwendung eines Deckglases, zu untersuchen. Dabei ist zu beachten, dass von der Vereinigung der beiden Geschlechtskerne bis zur Vollendung der ersten Teilung etwas über eine Stunde verläuft und dass die folgenden Teilungsperioden je etwas weniger als eine Stunde in Anspruch nehmen, d. h. zwischen der vollendeten zweiten und der vollendeten dritten Teilung verstreicht nicht ganz eine Stunde.

„Unter Berücksichtigung dieser Zeiträume kann man jedes beliebige Stadium mit leichter Mühe gewinnen, und man kann sich die verschiedenen Übergangsphasen namentlich dann sehr gut verschaffen, wenn man dem einzelnen Weibchen zunächst nur den einen Eisack wegnimmt und ihm den anderen zunächst belässt, um ihn nach einer Viertel- oder halben Stunde nachträglich zu konservieren.“ Von anderen Copepoden empfiehlt Häcker Canthocamptus, bei dem in Fortpflanzung befindliche Exemplare einen grossen Teil des Jahres hindurch vorkommen, ferner von pelagischen Süsswasser-Copepoden Heterocope und Diaptomus. Über Sida crystallina sagt er[1]:

Canthocamptus

Heterocope
Diaptomus
Sida crystallina

[1]) l. c. p. 89.

„Die Produktion von Wintereiern beginnt in unserer Gegend im Spätherbst, von Mitte Oktober an. Man fängt die Tiere mit einem Gazenetz und isoliert sofort die Weibchen mit reifen Ovarien, welche in Form von zwei schwarzen Strichen zu beiden Seiten des Darmes schon mit blossem Auge sichtbar sind, sowie eine Anzahl von Männchen in einem Glasgefäss mit See- oder Flusswasser (kein Wasserleitungswasser!). Bei der Auswahl der reifen Weibchen darf man sich nicht dadurch täuschen lassen, dass häufig die Leibeshöhle der Siden von einem Myxosporidium, einer Glugea-Art, durchsetzt ist, deren gelappte Massen bei schwacher Vergrösserung eine grosse Ähnlichkeit mit Dottersubstanz haben.

„Am besten ist es nun, wenn man die weitere Behandlung des Materials an Ort und Stelle vornehmen kann. Ist dies nicht möglich, so erfolgt der Transport . . . . wobei eine ein- bis zweistündige Eisenbahnfahrt von den Tieren gut vertragen wird. Zu Hause werden die Tiere ohne Wasserwechsel in Aquarien untergebracht, wobei mit Hülfe eines Durchschlüpfungsapparates oder durch Beifügung von Spirogyrafäden für Sauerstoff gesorgt wird. In den zwei bis drei nächsten Vormittagen wird man stets eine Anzahl Weibchen finden, welche ihre Eier frisch in den Brutraum entleert haben."

Eier. Frische Untersuchung. Henking zerquetscht die frischen Eier in der von ihm zur frischen Untersuchung des Hodens angegebenen, auf Seite 110 erwähnten Glycerinmischung. Er erzielt dadurch ein gutes Hervortreten der Chromosomen, während Plasma und achromatische Substanz nicht so gut konserviert wird.

Eier. Frische Untersuchung derselben

Entfernung der Schale abgelegter Eier. Man kann die Schale durch Behandeln mit verdünntem Eau de Javelle entfernen, wobei aber doch bei aller Vorsicht die Substanz des Eies mehr oder weniger angegriffen wird; oder man bringt die Eier aus dem starken Alkohol in 35 proz.; hierin blähen sich dieselben stark auf, indem sich die Schale vom Ei abhebt. Meist springt sie von selbst; ist das nicht der Fall, so zerreisst man sie mit Hülfe von Pinzetten, was nun meist leicht ohne Verletzung des Eies gelingt.

Entfernung der Schale derselben

Über das von Henking benutzte Verfahren zur Erweichung der Eier zum Zwecke des Schneidens siehe Seite 49.

Fixation

Fixation.

1. Nach Henking mit heissem Wasser und Alkohol. Die Eier, die von ihrer Schale und dem klebrigen Drüsensekret umgeben sind, kommen in ein Uhrschälchen mit kaltem Wasser, werden dann erst mit kochendem Wasser kurze Zeit übergossen, darauf in 70proz. Alkohol gebracht.
2. Einlegen in langsam auf 80—90° erwärmtes Wasser; Entfernung der Schalen; Einlegen entweder in 35proz. Alkohol auf 10 Minuten und dann in 70proz. Alkohol oder in Pikrin-Schwefelsäure (Kleinenberg).
3. Langsames Erwärmen der Eier in mit 3 Raumteilen Wasser verdünnter Kleinenberg'scher Pikrin-Schwefelsäure auf 80°, während der Dauer von 10 Minuten. (Diese beiden letzten Methoden sind brauchbar für Coleoptera und Orthoptera).
4. Heisser (30° C.) 90proz. Alkohol (Hydrophilus).
5. Abs. Alkohol und 25% Essigsäure (für Lernaea).
6. Heisser Alkohol mit etwas Sublimatzusatz (Crustacea; für Chironomus 30proz. Alkohol und Sublimat).
7. Essigsaurer Uran in konz. wässriger Lösung (Periplaneta).
8. Sublimat-Eisessig (konz. Sublimatlösung mit 20% Eisessig; Tardigraden).
9. Sublimat-Alkohol: Für Phyllopoden nach Samter und zwar in folgender Weise: Übergiessen der Muttertiere mit folgender auf 30° C. erwärmter Lösung: Sublimatlösung 90 bis 95, abs. Alkohol 10 bis 5; dann Auspräparieren der Eier und Anstechen eines jeden derselben. Einlegen der Eier in folgende auf 30° C. erwärmte Mischung: Sublimatlösung 80, abs. Alkohol 20; alle 10 Minuten wird dann der Alkoholgehalt dieser Lösung langsam erhöht. Zum Schluss 50proz. Alkohol.
10. Sublimat-Alkohol (Häcker): 70proz. Alkohol 100, konz. Sublimat 1—2; diese Mischung wird beinahe zum Sieden erhitzt. Für Sida kryst.
11. Sublimatlösung nach Gilson (Phyllopoden).
12. Heisse Sublimatlösung (Branchiopoden).

13. Flüssigkeit von Ripart und Petit (Crustacea).
14. Heisses Wasser mit Kalium bichromat oder Chromsäure. (Decapoda; nach Reichenbach Erwärmen in Wasser auf 60—70°; Einlegen entweder in 1—2 proz. Kaliumbichromat oder in 1/2 proz. Chromsäure auf 24 Stunden; fliessendes Wasser, Alkohol. Lepidoptera; nach Pobretzky Erwärmen in Wasser, dann 1/2 proz. Chromsäure 14—20 Stunden).
15. Pikrin-Salpetersäure (Xiphosura; Fixationsdauer 10 bis 24 Stunden). Empfohlen auch von Lee und Mayer um das Einwirken der Hitze zu vermeiden.
16. Chrom-Essigsäure (Arachnoides; nach Brauer für Skorpion: Die Eier werden 1—1 1/2 Minuten in beinahe siedendem Wasser abgetötet und kommen dann auf 2–6 Stunden in die Chrom-Essigsäure. Sheldon für Peripatus und zwar 0,5 proz. Chromsäure und 2 proz. Essigsäure āā).
17. Osmiumsäure in 0,5 bis 1 proz. Lösung (Peripatus).
18. Pikrin-Schwefelsäure (Hydrophilus und Dysticus. Dauer der Fixation in der heissen Fixierungsflüssigkeit 2—3 Minuten, darauf in der kalten 12 Stunden, dann Alkohol).
19. Pikrin-Schwefelsäure mit Osmiumsäure. Auf je 1 ccm kommt 1 Tropfen 1 proz. Osmiumsäure (Erlanger für Tardigraden; nachher Bleichung mit H_2O_2).
20. Mischung von 10 proz. Salpetersäure und Pikrin-Schwefelsäure āā (Munson für Xiphosura).
21. Alkoholische Pikrin-Schwefelsäure (Mc. Murrich für Isopoden).
22. Flemming'sche Lösung. Crustacea. Erlanger für Tardigraden; nach der Fixation Bleichung mit H_2O_2. Heymons kombiniert sie mit der Einwirkung heissen Wassers; er schneidet die Kapsel bei den Eiern der Blattiden an dem einen Ende auf und legt sie für 2 Minuten in heisses Wasser (90° C.); er öffnet sie vollends in der Chrom-Osmium-Essigsäure. Ebenso Brauer für die Eier von Euscorpius; sie kommen für 1—1 1/2 Min. in fast kochendes Wasser, dann für 10 bis 20 Minuten

in das Flemming'sche Gemisch. Auch Henking rühmt sie, nur darf sie nicht lange einwirken, um allzustarke Schwärzung des Dotters zu vermeiden. Er wendet sie kalt für $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde an; dann verdünnt er sie mit dem dreifachen Volumen Wasser; in dieser Verdünnung wirkt sie noch 2 Stunden ein; darauf Wasser, Alkohol. Oder man bringt sie mit dem Objekt in ein Reagenzglas und hält dieses so lange in kochendes Wasser, bis die Eier dunkel werden.

23. Flemming'sche Lösung; danach $^1/_{40}$ proz. Platinchloridlösung (Xiphosura: für die Eier auf dem Stadium unmittelbar nach dem Verlassen der Follikel. Munson bringt sie für kurze Zeit in Flemming, dann in das Platinchlorid.)
24. Heisse Pikrin-Essigsäure (Crustacea. Die Flüssigkeit ist kalt angewendet nach Henking unbrauchbar).
25. Perényi'sche (Lernaea) und
26. Zenker'sche Flüssigkeit (Lécaillon für Coleoptera; vor dem Fixieren Entfernen des Epichorions durch Eintauchen der Eier in Eau de Javelle (Chrysomela) oder in „huile de naphte" (Agelastica), Erwärmen der Zenker'schen Flüssigkeit auf 45° C. Fixationsdauer 12 Stunden, dann Wasser; Alkohol).
27. Platinchlorid-Pikrin-Osmium-Essigsäure nach Vom Rath (Häcker für Cyclops. Man lässt die Eisäcke 10 Minuten in dieser Lösung).
28. Jodjodkalium (nach Graber: Man fixiert in einer aut 60° erwärmten Jodjodkaliumlösung; dann in Alkohol. Cholodkowsky für Orthoptera (Jod 1, Jodkalium 2, Wasser 300). Die Objekte werden hierin einige Minuten bis zum Sieden erwärmt, dann 70 proz. Alkohol).

Ältere Entwicklungsstadien Fixation

Ältere Entwicklungsstadien. Fixation.

1. Sublimat,[1]) in 63 proz. Alkohol gesättigt. (Hexapoda. Deegener für Hydrophilus. Die Sublimatlösung wird auf 52° C. erwärmt; darin die Larven und Puppen getötet, aufgeschnitten und 24 Stunden weiter fixiert).

[1]) Siehe auch unter Nr. 6.

2. **Pikrin-Schwefelsäure** (Thoracostraca. Bethe für Mysis, ferner Waite: Eine Einwirkung von 15—30 Minuten ermöglicht eine leichte und vollständige Entfernung des Dotters: eine Fixationsdauer von 60—90 Minuten macht den Dotter schnittfähig. Heymons: Für ganz junge Larven von Blatta germ. und solche, bei denen Chitin gebildet ist; Öffnen des Chitinpanzers bei letzteren; dann in beiden Fällen Erwärmen des Fixierungsmittels auf 50° C. und Fixation in demselben; dann 63proz. Alkohol).
3. Flemming'sche Flüssigkeit (Thoracostraca. Waite: Eine Einwirkung von 20—30 Minuten erleichtert die Ablösung des Embryo vom Dotter; eine solche von 45—90 Minuten erlaubt es, das Ei mit dem Dotter zu schneiden).
3. Flemming'sche Flüssigkeit in Verbindung mit heissem Wasser. (Hexapoda. Heymons für Blatta germ.: Den dem Weibchen entnommenen Cocon schneidet man an dem Ende auf, das im Körper verborgen war und legt ihn auf 2 Minuten in auf 90° erwärmtes Wasser, dann in Flemming'sche Lösung. Hier Öffnen des Cocons; weiteres Fixieren der Embryonen; Wasser, Alkohol).
4. Sublimat-Eisessig: konz. wässrig. Sublimatlösung 3, Eisessig 1. (Diptera. Wahl für Eristalis. Die Fixierungsflüssigkeit wird bei kleinen Larven auf 60° C. erwärmt angewendet, bei grösseren injiciert).
5. Sublimat-Eisessig nach Roule: Konz. wässrig. Sublimatlösung mit $^1/_4$ des Volumens Eisessig. (Crustacea. Dauer der Fixierung wenige Minuten, solange bis das Objekt weiss wird, dann 40proz. Alkohol, der 3—4mal je nach 1 Stunde gewechselt wird; 50 und 60proz. Alkohol $^1/_2$ Tag, 70proz. 1—2 Tage, 80proz. 3—4 Tage, 90proz. Alkohol).
6. Sublimat, in 63proz. Alkohol gesättigt, kalt angewandt (Deegener für ältere Eier von Hydrophilus).
7. Heisser (70—75° C.) absolut wasserfreier Alkohol mit Sublimat (Brüel für die Larven und Puppen der Diptera.)

8. Sublimat-Alkohol (Apáthy): 2proz. Lösung von Sublimat in 40proz. Alkohol mit 5 % Essigsäure, (Pantel für die Larve von Thrixion; Betäubung in Salzwasser und Chloroform; dann heisses Wasser und Sublimat-Alkohol).
9. Sublimat-Alkohol nach Frenzel: Auf je 1—2 ccm einer halb gesättigten Lösung von Sublimat in 80proz. Alkohol kommt 1 Tropfen Salpetersäure. Fixationsdauer 5—10 Minuten. Dann in den Sublimat-Alkohol ohne Salpetersäure und in Alkohol (Bengtsson für Phalacrocera).
10. Flüssigkeit nach Perényi. (Coleoptera. Dauer der Fixierung 12—24 Stunden; das Chorion wird erst dann abpräpariert, wenn 70proz. Alkohol eine Woche lang auf die Eier eingewirkt hat.[1]) Xiphosura. Nach Patten und Hagen für Limulus). (Hexapoda. Nach Heymons für Blatta germ. nur geeignet zur Fixierung der äusseren Gestalt und der allgemeinen Organisationsverhältnisse).
11. Fixierung nach Cholodkowsky mit Jodjodkalium; siehe Seite 118 Nr. 28.
12. Platinchlorid-Pikrin-Osmium-Essigsäure nach Vom Rath (Bethe für Mysis).
13. Methode von Karawaiew. (Für die Larven von Anobium: Heisses Wasser 80° C. einige Sekunden, dann Gefrierenlassen im Ätherspray; Abschneiden eines Streifens von den Larven, damit das Fixierungsgemisch besser eindringt. Auftauenlassen, 24 Stunden Pikrin-Schwefelsäure.

Einige besondere Methoden
Entfernung des Chitins

Einige besondere Methoden. Entfernung des Chitins und nachträgliches Fixieren. Morgan für die Eier von Periplaneta. Eau de Labarraque wird auf das 5—6fache verdünnt und schwach erwärmt. Hierdurch wird die Eihülle nach 30—60 Minuten erweicht. Nun Fixierung in Pikrin-Schwefelsäure.

Färbung mit Hämatoxylin

Färbung mit Hämatoxylin (Weigert). Parker speziell für Homarus. Fixierung in heissem Wasser, Chromsäure oder Pikrin-Schwefelsäure (Kleinenberg). Die Schnitte kommen in $^1/_{10}$ proz.

[1]) Petrunkewitsch, Zool. Anzeig., Bd. 21, 1898.

Kalilauge ½ Minute; Auswaschen in Wasser kurze Zeit, dann in Hämatoxylin (Weigert) bei 50° C. 3 Stunden (zur Färbung der Nervenfasern).

mit Bismarckbraun und Hämatoxylin

Färbung mit Bismarckbraun und mit Hämatoxylin (Ehrlich) nach Henking. Bei Eiern, die mit heissem Wasser fixiert sind, ergibt eine Färbung mit einer konz. wässr. Bismarckbraunlösung eine gute Darstellung der Chromosomen, eine solche mit Ehrlich's Hämatoxylin ein Deutlichwerden des Arrhenoids und Thelyids Henking's.

»Durchsichtige Eier«

Balbiani macht die Eier (Insekten, Arachniden) künstlich durchsichtig, indem er sie in einen Tropfen Öl bringt, der aber nur die Oberfläche imprägnieren und nicht tiefer eindringen darf; die Entwicklung geht normal weiter.

Literatur zu Kapitel 6

Korschelt, Zool. Jahrb. IV, 1889. — La Valette St. George, Arch. mikr. Anat. Bd. 51/27, 1897/1886. — Koujawski, Bibl. anat. Bd. 6, 1898. — List, cit. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 6, 1889, p. 202 Anm. — Silvestri, cit. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 15. — Gross, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 69 1901; Zool. Jahrb. Abteil. Anat. u. Ontog. Bd. 18, 1903. — Will, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 41, 1885. — Paulcke, Zool. Jahrb. Abteil. Anat. u. Ontog. Bd. 14, 1900. — Munson, Journ. of Morph. vol. 15, 1898. — G. Herrmann, cit. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 9. — Gilson, La cellule T. 1. — E. Ballowitz, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 50, 1890. — K. Ballowitz, Internat. Monatsschr. Anat. Physiol. Bd. 11. — Tönniges, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 71, 1902. — Prenant, La cellule T. 3. — Carnoy, La cellule T. 1. — Henking, Zeitschrift wiss. Mikrosk. Bd. 8, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 49. — Wilcox, cit. Zeitschrift wiss. Mikrosk. Bd. 12. — Müller, Zool. Jahrb. Bd. 3, 1889. — P. u. M. Bouin, Bibl. anat. Bd. 7, 1899. — Verson, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 58. — Vom Rath, Arch. mikr. Anat. Bd. 46. — Bouin, Anat. Anz. Bd. 20, 1901. — Montgomery, Zool. Jahrb., Abteil. Anat. u. Ontog. Bd. 12, 1898. — Wheeler, Journ. of Morph. III, 1889. — Deegener, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 68, 1900. — Pedaschenko (für Lernaea), cit. nach Lee u. Mayer. p. 318. — Ritter, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 50, 1890. — Weissmann, Ishikawa cit. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 6, 1889. — Schenk, Mitt. a. d. embryolog. Institut Wien Bd. 2, 1880. — Samter, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 68. 1900. — Brauer, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 57; Arch. mikr. Anat. Bd. 43. — Kennel (für Peripatus), cit. nach Lee u. Mayer p. 317. — Patten, Journ. of Morph. Bd. 12. — Patten u. Hagen, l. c. Bd. 16. — Erlanger, Morph. Jahrb. Bd. 22 (cit. nach Lee und Mayer) p. 317. — Heymons (für Blattiden) Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 53, 1892. — Lécaillon (für Coleoptera), cit. nach

Lee u. Mayer, p. 315. — Graber, Morph. Jahrb. Bd. 13, 1880. — Cholodkowsky, Mém. l'Acad. St. Pétersbourg, Sér. 7, T. 38. — Reichenbach, Abh. Senkenb. naturf. Gesellsch. Bd. 14. — Waite, ref. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 17. — Wahl, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 70. — Schwartze, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 66. — Bengtsson (für Phalacrocera), cit. nach Lee u. Mayer, p. 314/315. — Apáthy, Pantel (für Thrixion), cit. nach Lee u. Mayer, p. 315. — Roule, Annal. Sc. nat. Zool. (7) T. 18, 1895. — Bethe, Zool. Jahrb. Abteil. Anat. u. Ontog. Bd. 8, 1895. — Brüel, Zool. Jahrb. Abt. Anat. u. Ontog. Bd. 10. — Petrunkewitsch, Zool. Anzeig. Bd. 21. — Karawaiew, cit. nach Lee u. Mayer, p. 315. — Morgan, ref. nach Zeitschrift wiss. Mikrosk. Bd. 6. — Parker, ref. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 8. — Balbiani, cit. nach Lee u. Mayer, p. 293. — V. Häcker, Praxis u. Theorie der Zellen- u. Befruchtungslehre, Jena 1899.

Kapitel 7

Mollusken Molluscoidea Tunicata

Mollusken[1]

Fortpflanzung
Limax

Fortpflanzung. Limax maximus. Man hält die Tiere in feuchtem Moos, unter dem sich eine 2 cm hohe Sandschicht befindet und füttert sie nach Kofoid am besten mit den Blättern des gewöhnlichen Wegerich, mit Apfelschalen oder Kohlblättern.

Die Zeit der Eiablage schwankt: Meisenheimer beobachtete sie im August; Henschman in Cambridge im September. Die Zahl der Eier bei einer Ablage wird von Henschman auf 40—50, von Meisenheimer auf 200—300 angegeben. Sie entwickeln sich in feuchtem Moos gut; ihre Feinde sind Milben, Fliegenlarven und einige Nematoden. 30 Tage nach der Eiablage schlüpfen die Jungen aus.

[1]) Über die Methoden von Hammar zur Darstellung der Verbindung zwischen den Blastomeren siehe Seite 79.

Arion Arion. Die Eiablage zieht sich über einen ganzen Tag hin. Um Befruchtungsstadien zu erhalten, lässt man nach Platner 70 bis 100 Eier ablegen und präpariert dann den obersten Teil des Uterus frei.

Männl. Geschlechtsorgane 1. Isolationspräparate Murex Paludina

Männliche Geschlechtsorgane. Köhler zerzupft die Hoden von Murex auf dem Objektträger und fixiert das Material mit Osmiumsäure-Dämpfen, oder zerzupft es, nachdem dasselbe vorher in Osmiumsäure (1 : 200 oder 1 : 1000) gelegen hat. Auerbach bringt auf den Objektträger einen kleinen Tropfen der Blutflüssigkeit von Paludina vivipara und verreibt in ihm dünne Scheiben vom Hoden dieses Tieres. Die Fixation wird bewerkstelligt durch Übergiessen folgender Mischung: Sublimat 4, Alkohol 25, Wasser 75. Diese Mischung wirkt nur einige Sekunden ein; dann Alkohol. Meves fixiert die Spermatozoen von Pygaera als Ausstrichpräparate in Sublimat-Eisessig. Pictet zerzupft die Hoden und untersucht die isolierten Elemente (Cymbulia, Sepia) in 1. Lösung von Dahlia in Meerwasser z. T. allein z. T. mit Essigsäure oder Osmiumsäure (Cymbulia). 2. Neutrale Lösung von Dahlia im Meerwasser. 3. 5—10proz. Lösung von Manganchlorür unter Zusatz von einigen Tropfen einer konz. wässr. Dahlialösung (Sepia). 4. Methylgrünlösung in 1proz. Essigsäure allein oder nach Fixation mit Osmiumdämpfen (Cymbulia, Sepia). 5. Jodtinktur, Kaliumpermanganatlösung (Cymbulia).

Pygaera Cymbulia Sepia

2. Fixation

Als Fixierungsmittel für den Hoden kommen in betracht

Paludina Helix Pygaera Arion Limax Murex

1. Kaltgesättigte Sublimatlösung: für Paludina (Auerbach). Nach Meves ist reines Sublimat für P. ungeeignet.
2. Sublimat-Eisessig: für Paludina, Helix, Pygaera.
3. Sublimat-Alkohol-Eisessig: für Paludina und Pygaera.
4. Sublimat nach Carnoy: für Helix, Arion, Limax (Prenant).
5. 3proz. Salpetersäure: für Murex, Helix, Arion, Limax (Köhler, Prenant).
6. Pikrin-Salpetersäure: für Murex (Köhler).
7. Hermann'sches Gemisch: für Paludina und Pygaera (Meves).
8. Flemming'sches Gemisch: für Helix, Arion, Limax (Prenant). Bei Paludina, Limax, Helix fixiert

Platner mit dem stärkeren Flemming'schen Gemisch 1 Stunde, verdünnt dann das Fixierungsmittel mit Wasser auf das 3—4fache und lässt das Material in dieser Lösung noch 24 Stunden stehen.

9. Fol'sche Mischung: für Helix, Arion, Limax (Prenant).

3. Färbung mit Carmin-Methylgrün

Einige besondere Methoden. Färbung nach Auerbach. Carmin in Verbindung mit Methylgrün. a) Gerlach'sche Carminlösung 36 Stunden oder länger; b) Abspülen in Wasser; c) Verdünnte Methylgrünlösung $^1/_2$ bis mehrere Stunden; d) abs. Alkohol 5—10 Minuten.

Säurefuchsin-Methylgrün

Säurefuchsin in Verbindung mit Methylgrün. Drei Möglichkeiten. I. Man löst 1 Teil Methylgrün und 1 Teil Säurefuchsin in je 1000 Teilen Wasser. Man setzt auf 50 ccm der Säurefuchsinlösung 1 Tropfen einer 10proz. wässrigen Eisessiglösung. Man mischt 2 Teile dieser Säurefuchsinlösung mit 3 Teilen Methylgrünlösung. In diese Methylgrün-Säurefuchsinmischung bei 20 bis 25° C auf 5—15 Minuten, dann abs. Alkohol für 5—15 Minuten bis 1 Stunde. II. a) Die oben erwähnte Säurefuchsinlösung 5 bis 15 Minuten; b) Abspülen in abs. Alkohol; c) Die oben erwähnte Methylgrün-Säurefuchsinlösung. III. a) Wässrige Methylgrünlösung; b) abs. Alkohol 5—10 Minuten; c) konz. Lösung von Säurefuchsin in abs. Alkohol 5—10 Minuten; d) Abspülen in abs. Alkohol.

Säurefuchsin-Viktoriablau

Säurefuchsin, verbunden mit Viktoriablau. a) Alkohol; b) Verdünnte wässrige Lösung von Viktoriablau 12 bis 20 Stunden; c) Abspülen in dest. Wasser; d) abs. Alkohol 10 Minuten; e) Alkoholische Lösung von Säurefuchsin 5 bis 10 Minuten; f) Abspülen in Alkohol abs.

4. Nebenkern

Färbung des Nebenkernes nach Platner. Durchfärbung mit dem Hämatoxylin (Pal[1]) und Differenzierung mit einer 1proz. alkoholischen Lösung von doppeltchromsaurem Kali.[2]) Für Limax und Paludina.

[1]) Siehe Seite 136.

[2]) Man hält sich „eine Lösung von 10,0 Kali bichromic. auf 300,0 Aq. dest. vorrätig, von der jedesmal für den Gebrauch 30 ccm mit 70 ccm starken Alkohols versetzt werden und zum Entfärben in dunklen Gläsern benutzt werden".

Jüngere Entwicklungsstadien
1. Lamellibranchiata
Dreyssena
Unio

Jüngere Entwicklungsstadien. Lamellibranchiata. Fixation. Für die Furchungsstadien von Dreyssena nach Meisenheimer

1. Sublimat;
2. Pikrin-Schwefelsäure.

Für Unio nach Lillie:

1. Perényi'sches Gemisch für 10—20 Minuten, Waschen, Alkohol von 70 %.
2. Perényi'sches Gemisch, dann gleich in 50proz. Glycerin, Färbung mit Schneider's Essigcarmin.

2. Gastropoda
a) Entfernung der Hüllen
Limax

Gastropoda. Entfernung der Hüllen. Bei Limax muss man vor der Fixierung die beiden äusseren Hüllen auf mechanischem Wege entfernen, wobei man sich der Doppelnadel von Kofoid bedient: Zwei Nadeln werden zusammen so in einen Nadelhalter gesteckt, dass die Entfernung ihrer Spitzen kleiner als der Eidurchmesser ist. Sie halten das Ei, eine andere Nadel sticht das Ei an. Man muss sich dabei hüten, dass sich der Embryo nicht mit der schleimigen Masse bedeckt, die zwischen äusserer und innerer Kapsel liegt, da sie nicht wieder fortzubringen ist. Die Beseitigung der Eiweisshülle erfolgt mit Hülfe einer Kochsalzlösung. Sie ist für Paludina 0,5proz. zu wählen. Oder man folgt Byrnes, der das Ei von Limax mit seiner Kapsel für einige Zeit, deren Dauer genau ausprobiert werden muss, in eine mit 5 % Essigsäure versetzte konz. Sublimatlösung bringt und dasselbe dann unter Wasser nach Sprengung der Kapsel von der Gallerte befreit. Bei Planorbis muss man nach Holmes darauf bedacht sein, eine Berührung mit Wasser zu vermeiden, da die Eier leicht quellen. Man entfernt die Kapsel in physiol. Kochsalzlösung, der man zweckmässig eine geringe Menge eines Fixierungsmittels zusetzt, um dadurch die Eier leichter von Eiweiss befreien zu können. Bei der mechanischen Freilegung der Embryonen von Limnaeus, dessen Eier äusserst leicht unter der Nadel fortgleiten, bringt man das Ei an den Rand eines Stückchens Fliespapier, das mit Kochsalzlösung (0,6 : 100) benetzt ist. Die Kapsel haftet am Papier und giebt dem Ei eine sichere Lage (Erlanger). Ohne Entfernung der Gallerthülle kommt Bochenek bei Aplysia aus, indem er die Eier mit Perényischer Flüssigkeit fixiert. Georgevitsch legt die in Sublimat (Gilson) fixierten und in Alkohol von 90 % aufbewahrten Ein-

Paludina
Limax
Planorbis
Limnaeus
Aplysia

schnüre einige Tage in 35 proz. Alkohol, ehe er die Eier mechanisch von ihren Hüllen befreit.

b) Fixation

Limax
Aplysia
Umbrella
Crepidula
Paludina
Dreyssena
Planorbis
Helix
Unio

Fixierungsmittel.

1. Pikrin-Schwefelsäure (für Limax, Aplysia, Umbrella, Crepidula, Paludina, Dreyssena, Planorbis).
2. Sublimat, kalt gesättigt (Limax, Helix, Unio, Paludina).
3. Sublimat in Verbindung mit Essigsäure: 5 proz. wässrige Sublimatlösung mit $2^1/_2$% Essigsäure (Carazzi für Aplysia).
4. Sublimat in Verbindung mit Eisessig und Glycerin: Man setzt zur konz. Sublimatlösung $^1/_4$ ihres Volumens an Eisessig und Glycerin (Planorbis und Limnaeus).

Limnaeus

5. Sublimatlösung nach Gilson (Aplysia).
6. Sublimat-Eisessig (Carazzi): Sublimat 5, Eisessig 2,5, Aq. dest. 100 (für Aplysia. Fixationsdauer einige Stunden, dann Wasser, 70 proz. Alkohol).
7. Sublimat konz. wässr. Lösung 200, 1 proz. Platinchlorid 100, Aq. dest. 200, Eisessig 5 (für Aplysia nach Carazzi. Fixationsdauer 1—2 Stunden, dann Wasser, Alkohol).

Arion

8. Chrom-Osmium-Essigsäure (Arion: Dabei beträgt die Dauer der Fixation $^1/_2$ Stunde; dann Wasser, Alkohol. Ferner für Planorbis, Limnaeus, Limax. Bei letzterem wird, wie oben erwähnt, das Ei mit Hülfe des Sublimat-Eisessiggemisches von der Kapsel und Gallerte befreit und dann auf 15—20 Minuten in schwache Flemming'sche Flüssigkeit gebracht. Auch das Fol'sche Gemisch bewährt sich bei Limax, wenn man es 1 Minute einwirken lässt und mit dem Pikro-Lithion-Carmin (Orth) färbt (Kofoid).
9. Chrom-Essigsäure (Washburn verfährt bei Limax in folgender Weise: Die Eier kommen in die Flemming'sche Chrom-Essigsäure auf 5 Minuten, dann in Wasser zur Entfernung der Hülle. Darauf wird der Dotter weiter für 5 Minuten in der Chrom-Essigsäure fixiert, kommt

dann in Wasser für 10 Minuten, dann in steigenden Alkohol von 35 % an)

10. Pikrin-Essigsäure (für Umbrella. Nach Mac Farland überhaupt das beste Fixierungsmittel für celluläre Studien an Molluskeneiern; von Byrnes auch für Limax angewandt, doch mit weniger gutem Erfolg als das Chrom-Osmium-Essiggemisch).
11. Pikrinsäure und Salzwasser (nach Metcalf für Chiton. Die Mischung soll das spez. Gewicht des Seewassers haben. Über ältere Embryonen vergl. Lee und Mayer).
12. Pikrin-Salpetersäure (für Umbrella; nach Henneguy für Helix: Die Eier kommen für 4—6 Stunden in das Fixierungsmittel. Öffnen des Eies, Entfernen des Eiweisses, vergl. weiter Lee u. Mayer, p. 311).
13. Pikrin-Sublimat (Rabl). Dazu etwas Essigsäure (Carazzi für Aplysia, vergl. Lee und Mayer, p. 313).
14. Perényi'sche Flüssigkeit (Aplysia. Nach Henschman für Limax; die Eier werden von ihren Hüllen befreit, kommen sodann in das Perényi'sche Gemisch auf 2—3 Minuten, dann in Aq. dest. für 5 Minuten, in 5 proz. wässr. Alaunlösung für 30 Minuten; dann Wasser, Alkohol).
15. Hermann'sche Flüssigkeit (Aplysia dep.).
16. Salpetersäure allein und in Verbindung mit Sublimat. (Physa; Kostanecki u. Wierzejski gebrauchen dabei zwei Methoden: 1. $1^1/_2$—2 proz. Salpetersäure; 2. Sublimat und 3 proz. Salpetersäure im Verhältniss von 2 : 1. Nach beiden Mitteln sofort in Alkohol).
17. Merkel's Gemisch (Limax: Washburn bringt die Eier nach einander in 1 proz. Osmiumsäure für 5 Minuten, Merkel's Gemisch für 4 Stunden: dann Entfernung der Hülle, Wasser, Alkohol).

Chiton

Untersuchung im frischen Zustande. Man untersucht das Ei nach Sprengung der Kapsel entweder in seinem eigenen Eiweiss oder in der von Bütschli angegebenen Lösung: Eiweiss 1, 5 proz. Kochsalzlösung 1, Wasser 9 (nach Tönniges bei Paludina).

c) Untersuchung im frischen Zustand

Herstellung von Oberflächenpräparaten (nach Conklin und Boutan): Fixation in Pikrin-Schwefelsäure für 15—30 Min.;

d) Oberflächenpräparate

allmälige Überführung in 70 proz. und 90 proz. Alkohol, dann in Wasser und Färben in: Hämatoxylin (Delafield) 1, Aq. dest. 6, Salzsäure einige Tropfen. Schliesslich Alkohol, Cedernöl, Balsam.

3. Cephalopoda

Cephalopoda. Für die Untersuchung ist nach Faussek Loligo günstiger als Argonauta oder Octopus wegen der leichteren technischen Behandlung.

a) Künstliche Befruchtung

Die künstliche Befruchtung hat Watase bei Loligo vollzogen. Hier trat die I Furche nach 1—2 Stunden, alle anderen je nach 5—10 Minuten auf.

b) Entfernung der Gallerte

Entfernung der Gallerte. Nach Faussek durch Behandlung der Eier mit Pikrin-Salpetersäure (Paul Mayer) nebst nachfolgender Färbung mit Hämalaun und Entfärbung durch Alaun: Man entfernt vor der Fixation möglichst viel von der Gallerte auf mechanischem Wege, ohne die Kapseln zu sprengen. Fixiert in Pikrin-Salpetersäure, wäscht mit Alkohol aus und färbt sofort mit Hämalaun auf 24 Stunden; dann 1 proz. Alaunlösung auf die gleiche Zeit. Dadurch hat die Gallerte ihre zähe Beschaffenheit verloren und es lassen sich nun die Eier glatt aus ihr herausschälen.

c) Fixation

Fixierungsmittel. Ausser der von Faussek empfohlenen Pikrin-Salpetersäure: Sublimatlösung, Sublimatlösung mit Essigsäure und Perényi'sche Flüssigkeit. Diese haben aber nach Faussek nicht den für die Technik so günstigen Einfluss auf die Gallerte wie die Pikrin-Salpetersäure.

Ältere Entwicklungsstadien

Ältere Entwicklungsstadien. Die Befreiung der Embryonen von ihren Hüllen erfolgt in gleicher Weise, wie bei den jüngeren Stadien.

1. Streckung der Embryonen
Limax
Dreyssena

Zur Streckung älterer Embryonen dient nach Meisenheimer bei Limax eine Behandlung mit 2 proz. Cocainlösung oder mit heissem Sublimat. Ebenso verfährt man nach demselben Forscher bei Dreyssena. Mazarelli setzt, um die Larven mit ausgestrecktem Velum und Fuss zu konservieren dem Fixierungsmittel (Pikrin-Schwefelsäure) einige Tropfen einer 1 proz. Osmiumsäure zu.

2. Fixation

Fixierungsmittel.

1. konz. Sublimatlösung; nach Rössler, mässig erwärmt, auf $^1/_2$ Stunde; dann noch auf die gleiche Zeit in die kalte Sublimatlösung.

2. Sublimat-Essigsäure: Je nach dem Alter der Tiere muss man den Gehalt an Essigsäure ändern. Bei den kleinsten Tieren $^1/_2$—1 %, bei den grösseren bis zu 2 % (Ahting für Lamellibranchiata).
3. Chrom-Osmium-Essigsäure (für Cephalopoden (Rottmann).
4. Pikrin-Schwefelsäure (Aplysia).
5. $^1/_3$ proz. Chromsäure (für Limax: Man verfährt so, dass man die äussere Hülle spaltet und den Embryo mit Eiweiss und innerer Hülle in das Fixativ bringt und zwar auf 2—3 Minuten, dann in Wasser, dem einige Tropfen Chromsäure zugesetzt sind; hier Befreiung des Embryos von der inneren Hülle. Dieser kommt dann auf weitere 1—2 Stunden in $^1/_3$ proz. Chromsäure; schliesslich Wasser, Alkohol.
6. Perényi'sche Flüssigkeit: Der von sämtlichen Hüllen befreite Embryo bleibt darin 2—3 Minuten, dann dest. Wasser 5 Minuten, 5 proz. wässrige Alaunlösung 30 Min., Wasser, Alkohol.
7. Pikrin-Salpetersäure (für Paludina).

Einige besondere Methoden 1. Versilberung der Eier (Planorbis)

Einige besondere Methoden. Holmes bringt die Eier von Planorbis in eine 0,75 proz. Lösung von Argentum nitric. und lässt sie von der Sonne bestrahlen. Zeigt das Mikroskop eine deutliche Zellbegrenzung, so kommen die Eier für einige Sekunden in Wasser, dem man einige Tropfen einer $^1/_5$ proz. Lösung von Natriumhyposulfit zugesetzt hat. Dann nicht Wasser, sondern auf einige Minuten eine konz. wässrige Lösung von Pikrinsäure. Schliesslich allmälig verstärkter Alkohol, Xylol, Balsam.

2. Zahnbildung (Radula)

Zum Nachweis der Zahnbildung in der Radula der Cephalopoden bedient sich Rottmann folgender Schnittfärbung: a) Eisenhämatoxylin nach Heidenhain; b) Nachfärbung mit einer Lösung von Bismarckbraun in abs. Alkohol; c) abs. Alkohol, Xylol, Balsam.

Bryozoa

Fixation.

Fixation. Nach Ladewig sind zum Fixieren nur vollkommen unversehrte Tiere zu nehmen. Das Mass für Intaktheit giebt ihr Vermögen sich auszustrecken. Um nun die Tiere im aus-

gestreckten Zustande fixieren zu können, cocainisiert man sie. Das geschieht nach demselben Autor dadurch, dass man behutsam unter Vermeidung jeder Erschütterung eine 1 proz. Cocainlösung dem Wasser, das die Tiere enthält zusetzt. Als Fixierungsmittel kommt in Betracht: 1. Sublimat, das in heissem Seewasser bis zur Sättigung gelöst ist. 2. Dieselbe konz. Sublimatlösung versetzt mit $^1/_{50}$ des Volumens an Eisessig. 3. Die unter 2. erwähnte Sublimat-Essigsäure, versetzt mit $^1/_{10}$ proz. Chromsäure.

Tunicata

Künstliche Befruchtung

Ascidien. Die **künstliche Befruchtung** nahm Kowalewsky mit Erfolg bei Phallusia mamm. vor.

Weibl. Geschlechtsorgane

Eierstöcke. Fixation. Zum Nachweis der Grenzen der Follikelzellen zerzupft Morgan die frischen Ovarien in stark verdünnter Osmiumsäure, wäscht dann in Aq. dest. aus und legt die Stücke für je $^1/_2$ Stunde in 1 proz. Silberlösung und 2 proz. Essigsäurelösung; dann Reduktion im Sonnenlicht und schliesslich Paraffineinbettung.

Zur Fixieruug der Gonaden bewährte sich Crampton die Pikrin-Essigsäure nach Boveri, entweder in der Mischung von a) konz. wässrige Pikrinsäure 100, Wasser 200, Eisessig 3; oder b) konz. wässrige Pikrinsäure 100, Wasser 200, Eisessig 6.

Männl. Geschlechtsorgane

Hoden. Die Elemente des Hodens untersucht Pictet 1. in 5 proz. wässriger Lösung von Manganchlorür mit Auflösung von Dahlia und Methylgrün in derselben. 2. In Methylgrün, gelöst in 0,1—3 proz. Essigsäure. 3. in dünner Kalilauge zum Studium des Spiralfadens.

Entwicklungsstadien 1. Beschaffung derselben

Entwicklungsstadien. Beschaffung von Untersuchungsmaterial von Distaplia magnil. (nach v. Davidoff): Um Embryonen zu erhalten, schneide man eine in Entwicklung begriffene Kolonie parallel zur Basalfläche des Stockes in 4—5 mm dicke Scheiben. Man erhält so auf ganz verschiedenen Entwicklungsstadien befindliche Embryonen, die teils noch in den Bruttaschen der Muttertiere liegen, teils beim Hineinbringen der Scheiben in die Fixierungsflüssigkeit herausfallen.

2. Fixation

Fixationsmittel.

1. Pikrin-Schwefelsäure. Maurice und Schulgin legen die ganzen oder in Stücke zerschnittenen Stöcke von

Amaroecium in Wasser und giessen das gleiche Quantum kochender Pikrin-Schwefelsäure hinzu. Nach 1/2 Stunde kommt das Material in Alkohol. Ferner geeignet für Diplosoma.

Amaroecium

Diplosoma

2. Chromsäure (Seeliger für Pyrosoma). Pyrosoma
3. Alkohol abs. (für Pyrosoma).
4. Eisessig nach Beneden u. Julin[1]) (für Botryllus). Botryllus
5. konz. Sublimatlösung 3, Eisessig 1 (für Distaplia. Fixationsdauer 1/2—1 Stunde; dann Aq. dest. 5—10 Minuten; 40proz. Alkohol 1 Stunde; dann höherer Alkohol; vergl. v. Davidoff. Ferner für Botryllus und Diplosoma). Distaplia
6. Heisse Sublimatlösung (nach Oka für Botrylliden).
7. Chrom-Essigsäure (Diplosoma).
8. Glycerin und Eisessig und Wasser: Diese aus gleichen Teilen der drei Mittel bestehende Mischung wandte Samassa bei den Embryonen von Ciona an, er färbte dann mit Essigcarmin (Schneider). Ciona
9. Pikrinsäure-Eisessig (3 : 1) nach v. Davidoff für Distaplia. Fixationsdauer 3—4 Stunden; 70proz. Alkohol. Distaplia
10. Perényi'sche Flüssigkeit und Pikrin-Salpetersäure; beide für Ciona.

Färbung der Schnitte mit Methylgrün-Säurefuchsin (Bancroft für Distaplia). Die Schnitte kommen in 1. 1proz. mit Essigsäure versetzte Säurefuchsinlösung 2, 1proz. Methylgrünlösung 3 für 15 Minuten. Dann in 2. 1proz. Methylgrünlösung. Darauf Alkohol u. s. w. Balsam.

Literatur zu Kapitel 7

Meisenheimer, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 62, Bd. 69. — Kofoid, cit. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 14. — Platner, Arch. mikr. Anat. Bd. 27, Bd. 33. — Köhler, Rec. Zool. Suisse vol. 5, 1889. — Meves, Arch. mikr. Anat. Bd. 61. — Pictet, Mitt. zool. Stat. Neapel, Bd. 10. — Prenant, La cellule T. 4. — Lillie, cit. nach Lee u. Mayer, p. 313. — Byrnes, Journ. of Morph. vol. 16, 1899. — Erlanger, Arch. Biol. T. 14, 1895. — Bochenek, ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 16. — Georgevitsch, Anat. Anz. Bd. 18. —

[1]) Vergl. Arch. Biol. Tome 6, 1886.

Carazzi, Anat. Anz. 17, cit. nach Lee u. Mayer, p. 312. — Washburn. cit. nach Lee u. Mayer, p. 312. — Mac Farland, Zool. Jahrb. Abt. Anat. Bd. 10, 1897. — Metcalf, cit. nach Lee u. Mayer, p. 313. — Henneguy, cit. nach Lee u. Mayer, p. 311. — Henchman, vergl. Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 8. — Kostanecki u. Wierzejski, Arch. mikr. Anat., Bd 47. — Tönniges, Zeitschr. wiss. Zool., Bd 61. — Conklin, Journ. of Morph. vol. 13, 1897. — Faussek, Mitt. Zool. Stat. Neapel Bd. 14, 1900. — Watase, Journ. of Morph. vol. 4, 1891. — Mazzarelli, ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., Bd. 11. — Rössler, Zeitschr. wiss. Zool., Bd. 41. — Ahting, Jen. Zeitschr. Naturw., Bd. 36. — Rottmann, Zeitschr. wiss. Zool., Bd. 70. — Holmes, Journ. of Morph. Bd. 16, 1899. — Ladewig, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 67, 1900. — Ostroumoff, Mitt. Zool. Stat. Neapel, Bd. 7. — Seeliger, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 49, Jen. Zeitschr. Naturw., Bd. 23. — Kowalewsky, Mém. l'Akad. Sc. St. Pétersb. 7. sér., T. 38. — Morgan, Journ. Morph. Boston vol. 4, 1891. — Crampton, Journ. of Morph. vol. 15, Suppl. 1899. — v. Davidoff, Mitt. Zool. Stat. Neapel Bd. 9, 1889—91. — Maurice u. Schulgin, Annal. Sc. nat. zool. S. 4, T. 17.[1] — Salensky, Mitt. Zool. Stat. Neapel, Bd. 11. — Hjort, Mitt. Zool. Stat. Neapel. Bd. 10. — Oka, Zeitschr. wiss. Zool., Bd. 54. — Samassa, Arch. mikr. Anat., Bd. 44. — Castle, cit. nach Lee u. Mayer, p. 309. — Bancroft, cit. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk., Bd. 17.

Kapitel 8

Amphioxus Petromyzon Selachier Teleostier Aufzucht

Amphioxus

Fortpflanzung

Die Laichzeit fällt nach Hatschek, Van der Stricht, Sobotta in Messina in den April, in Neapel in den Juni. Das Laichgeschäft ist an bestimmte Tageszeiten gebunden; meist findet es zwischen 5 und 8 Uhr abends statt. Alle Tiere eines Fundortes laichen an denselben Tagen; dazwischen gibt es Tage, an denen das Laichgeschäft ganz ruht. „Wenn man zur Laichzeit die Tiere aus dem Sande heraussucht und sie wieder in etwas Wasser bringt, so entleeren sie die Geschlechtsprodukte meist schon nach $^1/_2$ Minute, spätestens nach 2—3 Minuten. Die Eier sind als feine weisse Punkte eben noch mit blossem Auge zu erkennen . . . . 45—50 Minuten nach der Besamung der Eier ist die erste Furchungsspindel ausgebildet. Am folgenden Morgen ist schon das Gastrulastadium

[1]) Cit. nach Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. 2.

erreicht. Im Laufe des Tages findet dann die Bildung der Ursegmente statt." (H. E. Ziegler.) Nach 48 Stunden ist die ganze Embryonalentwicklung beendet (Hatschek, Ballowitz).

Junge Entwicklungsstadien. Zur Fixation sind verwandt worden:

Junge Entwicklungsstadien Fixation

1. Ein Gemisch von Alkohol-Glyzerin-Eisessig aa. Samassa empfiehlt es zur Untersuchung der Eier in toto; sollen dieselben später geschnitten werden, so kann man sie nachträglich mit Pikrin-Essigsäure behandeln.
2. Sublimat mit 5 % Eisessig (Samassa, Morgan und Hagen).
3. Flemming'sche Lösung. Nach Sobotta ganz besonders für Befruchtungsstadien geeignet; Fixationsdauer 24 Stunden.
4. Hermann'sche Lösung. Ebenfalls für Befruchtungsstadien (Van der Stricht).
5. Pikrin-Schwefelsäure (Kleinenberg). Nach Hatschek geeignet für Furchungsstadien. Dasselbe Fixationsgemisch wendet auch Burchardt an. Man kann ferner die ganzen laichenden Tiere fixieren: nach Sobotta in Pikrin-Essigsublimat, nach Ballowitz in Hermann'scher Flüssigkeit. Bei letzterem Mittel muss man die Tiere zerstückeln, um das Eindringen der Fixierungsflüssigkeit zu erleichtern, bei dem ersteren ist das nicht nötig (Sobotta).

Ältere Stadien. Fixierungsmittel.

Ältere Entwicklungsstadien Fixation

1. 0,5 proz. Osmiumsäure. Hatschek: für Embryonen vom Beginn der Ursegmentbildung an. Zu dem unter dem Deckglas liegenden Embryonen lässt man vorsichtig Osmiumsäure bis zur leichten Bräunung zufliessen, verdrängt dann dieselbe durch Glyzerin.
2. Pikrin-Sublimat (Joseph).
3. Flemming'sche Lösung.
4. Perényi'sche Lösung (Joseph).

Petromyzon

Fortpflanzung

Die Laichzeit fällt in die ersten Frühlingsmonate, nach Balfour in die zweite Hälfte des April. Nach Lubosch laichen sie auch in der Gefangenschaft und ist im Beginne des Laichgeschäftes folgender Unterschied zwischen Männchen und

Weibchen wahrzunehmen: „Der Urogenitalporus mündet bei den Männchen in eine lange feine Papille, die, in Ruhe schwanzwärts dem Körper anliegend, beim Ausspritzen des Spermas sich etwa bis zu einem Winkel von 40° abhebt. Zwei Wülste umziehen die Papille. Der gesamte Körper des Männchens ist um diese Zeit schlank, verglichen mit den plumpen, von Eiern gefüllten Leibern der Weibchen. Bei diesen mündet der Urogenitalporus auf einer flachen, breiten Erhebung, die ebenfalls jederseits von einem Wulst umzogen wird. Um die Zeit des Laichens verändern die Tiere auch ihre Farbe in ein eigentümliches, schmutziges Gelb."

Künstl. Befruchtung

Künstliche Befruchtung. Nach den Angaben von Herfort bleiben bei der sogenannten nassen Befruchtung viele Eier unbefruchtet, weshalb vor ihr die trockene den Vorzug verdient. Bei der ersteren füllte Herfort flache emaillierte Schalen halb mit Wasser und strich in dieses von dem Weibchen die Eier hinein. Dann wurde unter Umrühren mit einem Glasstabe durch Streichen des Männchens Sperma zugesetzt. Die trockene Befruchtung wurde so vorgenommen, dass man Eier und Sperma je in eine leere Schüssel entleerte. Dann mischte man mit der Fahne einer Feder Sperma unter die Eier und setzte nun erst Wasser den letzteren zu. Nach Owsiannikow kann man die in eine Schüssel entleerten Eier und ebenso das Sperma in einer feuchten Kammer 12 bis 18 Stunden entwickelungsfähig halten. Um die Entwickelung zu studieren, bringt man die Eier in eine Glaskammer unter das Mikroskop und fügt Sperma hinzu. Kupffer und Benecke bringen die Eier und den Samen an verschiedene Stellen derselben Schale, setzen zum Sperma Wasser und lassen dasselbe durch Neigen der Schüssel zu den Eiern fliessen.

Die Befruchtung erfolgt sehr schnell; der einleitende Vorgang derselben ist schon nach einer halben Minute verstrichen (Ballowitz).

Fixation

Fixation.[1]) Brauchbare Fixierungsmittel sind:

I. Für jüngere Entwicklungsstadien:

1. Pikrin-Platinchlorid-Osmium-Essigsäure (Vom Rath).
2. Pikrin-Platinchlorid-Essigsäure (Vom Rath).

[1]) Lubosch (Jen. Zeitschr. f. Naturw. Bd. 38 1903) sagt p. 677 über die Fixation des Neunaugeneies Folgendes: „Die gesamte Form der Eier wird durch nichts so vollendet schön erhalten, wie durch heisse Chromsäure in Konzentration von $1/3$—$1/2$ Proz. (nach Born). Indess ist die Färbbarkeit dieser Objekte sehr

3. Sublimat-Eisessig.
4. Reine Sublimatlösung.
5. Pikrin-Schwefelsäure (Kleinenberg).
6. Flemming'sche Flüssigkeit, entweder die Originalmischungen (Hatta, Kupffer) oder solche mit etwas erhöhtem Osmiumsäuregehalt (Böhm). In der Flemming'schen Flüssigkeit bleiben die Eier eine halbe Stunde (Kupffer, Böhm), dann Aqua dest., Alkohol.

II. Für ältere Entwicklungsstadien:
1. Reine Sublimatlösung.
2. Sublimat-Eisessig.

Fische

Weibl. Geschlechtsorgane Fixation (Selachier Teleostier)

Weibliche Geschlechtsorgane. Fixierungsmittel:
1. Sublimat-Eisessig: auf 20 ccm einer kalten konz. Sublimatlösung 7 Tropfen Eisessig. Fixationsdauer 3—5 Stunden; Alkohol (Selachier).
2. Pikrin-Schwefelsäure (Selachier).
3. Reine Sublimatlösung (Teleostier und Selachier).
4. Flemming'sche Flüssigkeit (Selachier u. Teleostier).

Männl. Geschlechtsorgane 1. Zerzupfungspräparate

Männliche Geschlechtsorgane. Zerzupfungspräparate. Dazu eignet sich eine Behandlung der Hoden entweder mit der Flüssigkeit von Ripart und Petit oder mit der von Masquelin empfohlenen 3 proz. wässrigen Pikrinsäurelösung. Färbung der Isolationspräparate mit Methylgrün unter Essigsäurezusatz.

2. Fixation Selachier Hecht Barsch Forelle Schlei

Fixierungsmittel:
1. Flemming'sche Flüssigkeit (Selachier).
2. Sublimatlösung nach Roule: konz. wässrige Sublimatlösung mit 20—25 % Essigsäure (Selachier).
3. Hermann'sche Flüssigkeit.
4. Heisse Zenker'sche Flüssigkeit (letztere beiden für Hecht, Barsch und Schlei nach Peter).
5. Stephan fixiert mit Flemming'scher Flüssigkeit; behandelt dann die Objekte zuerst für 24 Stunden mit

herabgesetzt. Zenker'sche Flüssigkeit ist für dotterlose Eier das Ideal eines Fixierungsmittels. Bei dotterreichen Eiern dringen Sublimatgemische schlecht ein .... doch liefern sie für das Follikelepithel und die Eihüllen und die peripherischen Dottermassen gute Bilder."

einer Mischung, die aus gleichen Teilen Acid. pyrolignos. und 1 proz. Chromsäure besteht, darauf für 48 Stunden mit einer 2 proz. Kaliumbichromatlösung nach Benda. Die Färbung nahm er u. a. auch nach Benda mit Eisenalizarin und mit Toluidinblau vor.

Weitere besondere Methoden sind: Verwendung des Alizarins zum Studium der Spermatogenese nach Rawitz. Ferner Färbung mit Eisenhämatoxylin-Säureviolett [oder Lichtgrün] (Benda) nach Peter. Als Färbemittel dient die von F. Hermann angewandte sogenannte Pal'sche Hämatoxylinlösung: 1 g Hämatoxylin, 70 ccm abs. Alkohol, 30 ccm Aqua dest. In der $2^1/_2$ proz. wässrigen Lösung von Eisenoxydammon $^1/_2$—1 Tag (wie Meves), in der Farblösung 1—2 Tage, dann Differenzierung in der Beize. Säureviolett (Lichtgrün): 0,2 : 80 ccm abs. Alkohol (Benda).

Laichzeiten
Pristiurus
Torpedo
Scyllium

Laichzeiten. I. Selachier. Pristiurus: Am häufigsten im April und Mai (Neapel); Torpedo: Ende April und Anfang Mai (Neapel); Scyllium catulus, Eierablage: Frühling und die Wintermonate. Die Kapseln der Eier sind frisch gelegt (im Aquarium) von weissgelber Farbe und dunkeln später, sodass man jüngere und ältere Stadien unterscheidet. (Schmidtlein.)

Acipenser

II. Ganoiden: Acipenser sturio: Juli; Acipenser ruthenus: Mai und Juni.

Teleostier

III. Teleostei: Die Laichzeiten notiere ich nach den Angaben von Böhm und Oppel (Taschenbuch). „Asche: März, April; Amaul: April, Mai; Barbe: Mai, Juni; Barsch: März, April, Mai; Bartgrundel (Schmerle): März, April; Elritze: Mai, Juni; Felchen: November, Dezember; Forelle: Oktober, November; Gareisl (Karausche): Juni; Gründling: Mai, Juni; Hecht: April, Mai; Huchen: April; Karpfen: Mai, Juni; Kaulbarsch: April, Mai; Lachs: September, Oktober, November; Renke: November, Dezember; Rotauge: April. Mai; Saibling: Juni, Oktober, November; Schleie: Mai, Juni; Waller (Wels): Juni."

Durchsichtig sind u. a. die Eier vom Barsch und Stichling.

Künstl. Befruchtung

Künstliche Befruchtung. Auch hier unterscheidet man zwischen nasser und trockener Befruchtung. Bei der ersteren, die weniger sicher ist, entleert man durch Streichen des Tieres die Eier in ein Gefäss mit Wasser. Dann setzt man hierzu das Sperma,

das man ebenfalls durch Abstreichen gewinnt. Bei der trockenen Befruchtung werden Eier und Samen für sich allein in je ein Gefäss gebracht; dann mischt man mit einer Feder Sperma unter die Eier, lässt diese $^1/_2$ Stunde stehen und bringt sie danach in die Fischbruttröge. Nach Böhm und Oppel soll man das Streichen des Weibchens zur Entleerung der Eier nur so lange fortsetzen, bis etwas Blut aus der Analöffnung herauskommt. Ferner lassen beide Autoren das Sperma in geringer Menge direkt auf die Eier tropfen und vermischen beides mit der Fahne einer Gänsefeder. Dann kommt Wasser hinzu, bis die Eier eben bedeckt werden. Nach 10 Minuten Abgiessen des Wassers und dann so oft Erneuern desselben, bis keine Trübung mehr wahrzunehmen ist. Bei Gasterosteus muss man den Hoden der Bauchhöhle entnehmen und zerschneiden, um Samen zu gewinnen.

Gasterosteus

Künstliche Befruchtung bei Cristiceps arg. nach Kopsch. Cristiceps arg. laicht in Neapel im März und April. Die Eier reifen in der Gefangenschaft; darum ist es gut, die weiblichen Exemplare erst eine Zeit lang im Aquarium zu halten. Die Tiere lassen sich leicht züchten; die Weibchen werden am besten an ihrer Korpulenz erkannt, die zur Laichzeit bedeutend ist. Die Eier sind reif, wenn sie gross und durchsichtig sind und wenn sie beim Schütteln des Ovariums im Seewasser leicht frei werden und die Haftfäden zu einer einheitlichen Masse sich verflechten. Das Sperma ist brauchbar, wenn die Spermatozoen leben. Dasselbe darf nicht mit Seewasser in Berührung kommen.

Cristiceps

„Die Vornahme der Befruchtung gestaltet sich folgendermafsen: Man stelle bereit: das Mikroskop, Schere, Pinzette, einen Objektträger mit Hohlschliff, ein Deckglas, zwei Uhrschälchen voll Seewasser. Zuerst wird ein Männchen getötet, die Hoden herausgenommen und in den Hohlschliff des Objektträgers gelegt. Dann schneidet man ein Stückchen Hoden ab und zerdrückt es auf dem ebenen Teil des Objektträgers nach Zusatz von einem Tropfen Seewasser mit Hilfe des Deckglases und sieht sofort nach, ob die Spermien sich lebhaft bewegen und in reichlicher Menge vorhanden sind. Ist dies der Fall, so schiebt man das Deckglas über den Hohlschliff und schützt dadurch die dortliegenden Hoden vor dem Trocknen. Hat man geeignete Hoden gefunden, so suche man das dickste Weibchen aus, nehme jedes Ovarium für sich aus der Bauch-

höhle und schüttle es in einem Uhrschälchen voll Seewasser leicht hin und her, bis die Haftfäden der Eier sich mit einander zu einer Masse verflechten. Alsdann fasst man diese Masse an und schüttelt noch ein wenig die Eier hin und her, wodurch aus den verflochtenen Fäden ein Strang wird, an dessen Oberfläche die einzelnen Eier wie die Beeren einer Traube hängen. Nun zerdrückt man die Hoden in dem Hohlschliff des Objektträgers (ohne Wasserzusatz!) und bringt die Eier in die zerdrückte Hodenmasse hinein. Das an ihnen befindliche Wasser ist zur Verdünnung des Spermas völlig genügend. Nach einer Minute werden die Eier in ein Uhrschälchen mit reinem Seewasser gebracht und durch leichtes Bewegen von den Hodenteilchen befreit. Danach kann man sie in fliessendem Wasser auf Algen liegend weiter züchten."

Aufzucht

Aufzucht. Zur ferneren Entwicklung kommen die befruchteten Eier der Fische in sogenannte Fischbruttröge, deren es eine ganze Anzahl verschiedenster Systeme gibt. Für Laboratoriumszwecke hat sich besonders der von La Valette St. George konstruierte, aus Fayance hergestellte Apparat bewährt, der in Abbildung 18 dargestellt ist.[1])

Fischbruttröge 1. nach La Valette St. George

Fig. 18.

Apparate grösserer Dimensionen sind die sogen. kalifornischen Bruttröge nach dem System von dem Borne und Weeger. Speziell für Forelleneier haben Warmbrunn, Quilitz & Co. (Berlin) sogen. „Selbstausleser" hergestellt, bei denen der Zufluss des Wassers so reguliert werden kann, dass die abgestorbenen Eier fortgetrieben werden, während die lebenden zurückbleiben. (Fig. 19; 20.)

2. »Selbstausleser«

In den meisten Fällen wird man bei embryologischen Untersuchungen mit folgenden kleinen Apparaten auskommen, die in ein grösseres Bassin, in dem Wasser mehr oder weniger stark strömt,

3. nach Röthig

[1]) Die Fig. 18 ist der Arbeit von La Valette St. George (Arch. mikr. Anat. Bd. 21 p. 242) entnommen.

hineingehängt werden. Der eine (Abbildung 21) besteht ganz aus

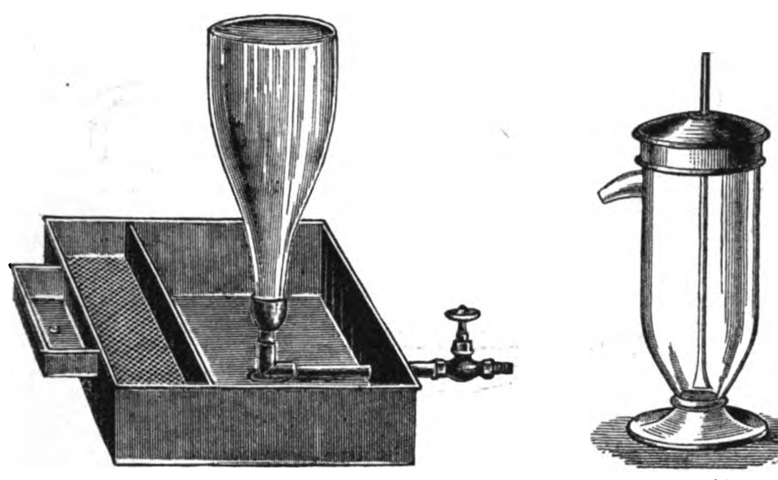


Fig. 19. Fig. 20

Messing, er ist durch einen aufgelegten Deckel verschlossen;[1]) bei dem anderen (Abbildung 22, S. 140) sind die Stangen aus Glas; Boden, Wände und Deckel werden hergestellt aus aufgebundenen Gazestreifen.[2])

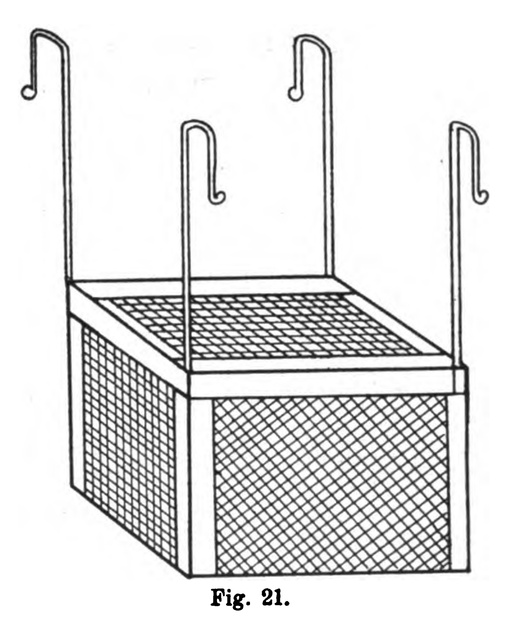


Fig. 21.

Für viele Fischeier ist es nötig, dass ihnen regelmässig und genügend Sauerstoff zugeführt wird; das erreicht man durch die Durchlüftungsanlagen, die in grösseren Instituten und Aquarien vorhanden sind. Ist das nicht der Fall, so muss man den Zufluss

---

1) Ähnliche Apparate verwendet auch Kopsch („Gastrulation und Embryobildung bei den Chordaten", Leipzig 1904 p. 38.)

2) Das Glasgestell ist angefertigt worden von Herm. Kobe, Berlin, N.W. Hannoversche Str. 14.

des Wassers so einrichten, dass Luft mitgerissen wird, oder man bedient sich kleiner Durchlüftungsapparate, von denen in Abbild. 23

Durchlüftungs-apparat

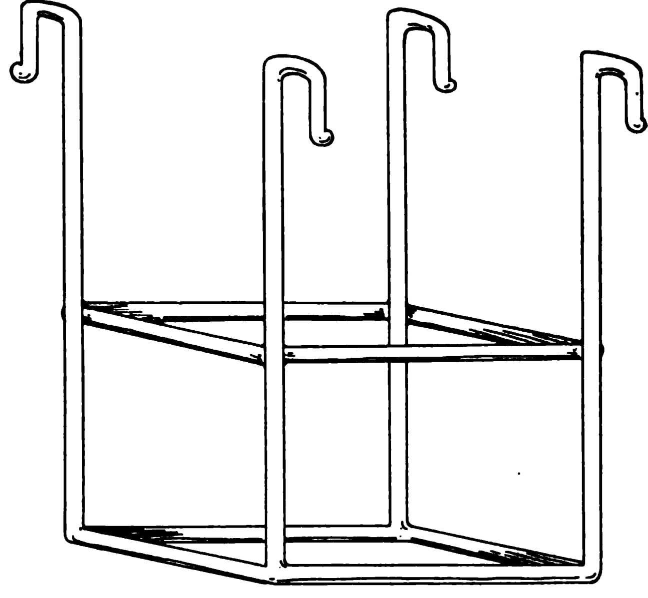


Fig. 22.

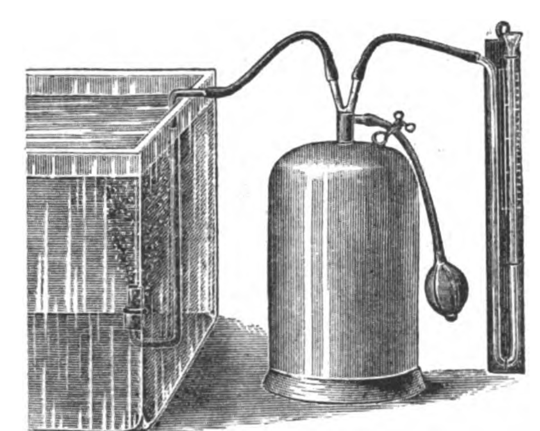


Fig. 23.

der von R. Simon konstruierte dargestellt ist, der von der Firma Warmbrunn, Quilitz & Co. (Berlin) bezogen werden kann.

Futtermittel

Da das Aufziehen der jungen Brut sehr oft an der Fütterungsfrage scheitert, so mögen einige Angaben hier Platz finden, die mir von P. Stieler, Berlin, gemacht worden sind. In der allerersten Zeit kann man die Tiere mit Infusorien füttern, die sich in dem Aufguss getrockneter Salatblätter finden. Oder man verwendet eines

der gebräuchlichen Fischfutter, die in den Aquarienhandlungen zu haben sind; zu empfehlen ist dasjenige von Paul Stieler, Berlin. Man weicht eine kleine Portion desselben mit Wasser auf und lässt es langsam von der Oberfläche des Wassers her sich zu Boden senken. Sind die Tiere grösser, so gibt man ihnen geschabtes Fleisch, aber kein Schabefleisch, da dies oft Präservesalz enthält, Cyclops, Daphnien, Mückenlarven.

Die künstliche Befruchtung und das Züchten der Fische wird von vielen Fischzuchtanstalten und Aquarieninstituten im Grossen betrieben, von denen man daher leicht Material zu entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen erhalten kann. So liefern:

Fischzucht-anstalten

A. Befruchtete Eier von:

1. Forelle: Die Kais. Fischzuchtanstalt bei Hüningen, Post: St. Ludwig, Elsass (im November, Dezember).
2. Zander und Plötze: Die von dem Borne'sche Fischerei, Berneuchen, Bez. Frankfurt a. d. O. Ferner Fischermeister Herm. Würke, Dammendorf bei Grunow, Bez. Frankfurt a. d. O. (im Mai).
3. Karpfen, Barsche, Goldorfe: Die von dem Borne'sche Fischerei.

B. Laichfähige Exemplare von:

1. Zander: Fischermeister Herm. Würke.
2. Goldorfe (Ende März), Karpfen (Anfang Mai): Herm. Maass, Ratsschneidemühle bei Berlinchen (Neumark).
3. Bleie, Schleie, Zander und andere Fische: Fischermeister Joseph Kraatz, Angermünde.

Verschiedene ausländische Fische kann man in laichreifen Exemplaren, sowie befruchtete Eier derselben beziehen durch: 1. das Aquariuminstitut von Paul Stieler, Berlin S., Prinzenstrasse 76; 2. das Aquariuminstitut von Otto Preusse, Berlin C.; 3. die von dem Borne'sche Fischerei.

Entwicklungsstadien. Selachier. Fixation. Brauchbare Fixierungsmittel sind:

Entwicklungs-stadien
1. Selachier
a) Fixation

I. Für jüngere Entwicklungsstadien: gesättigte wässrige Sublimatlösung mit 5 % Eisessig (Rückert, H. Ziegler).

II. Für ältere Entwicklungsstadien:

1. konz. Sublimat in Meerwasser auf 5—15 Minuten. Für Embryonen von 1—10 cm Länge (Lo Bianco). Nach Ziegler empfiehlt es sich, die Embryonen in situ auf dem Dotter zu härten und den Dotter erst später abzuschneiden.
2. Sublimat nach Apáthy.
3. Sublimat-Chromsäure: konz. Sublimat, 1 proz. Chromsäure aa, auf 15 Minuten, dann Alkohol. Für Embryonen von Torpedo (Lo Bianco).

Torpedo

4. Sublimat-Eisessig: Sublimat 90, Eisessig 10 (Torpedo marm.).
5. Sublimat 100, Eisessig 4.
6. Platinchlorid-Sublimat (Rabl) für Torpedo marm.
7. Pikrin-Schwefelsäure.
8. Die Flüssigkeit von Perényi (Spinax niger).

Spinax

9. Die Nowack'sche Flüssigkeit (siehe über dieselbe Seite 173).

b) Untersuchung des lebenden Embryo

Untersuchung des lebenden Embryo: Nach dem Vorgange von His, dem Kastschenko folgte, schneidet man von der hornigen Eischale die oberflächlichen trüben Schichten ab und hat dadurch die Möglichkeit, durch die nunmehr durchsichtige Eischale den lebenden Embryo zu beobachten.

2. Teleostei
A) Junge Entwicklungsstadien
a) Fixation

Teleostei. Zur Verwendung kommen folgende Fixationsmethoden: A. Für jüngere Entwicklungsstadien

1. $^1/_3$proz. wässerige Chromsäure. Die Eier kommen in die Säure auf 12 bis 24 Stunden; dann fliessendes Wasser, in dem sich die Eischale abhebt. Dadurch ist es möglich, den Teil des Eies, der die Keimscheibe enthält, abzuschneiden. Die so erhaltenen Segmente werden in Wasser gewaschen (Böhm und Oppel).
2. H. E. Ziegler empfiehlt für Lachs und Forelle: „Einlegen in $^1/_2$proz. Chromsäure mit etwas Salpetersäure (etwa $^1/_2$%) für 24 Stunden, dann in Wasser für 12 Stunden, nachher Anstechen der Eihaut mit einer Nadel, darauf 30 proz. Alkohol für 12—24 Stunden, dann 70 proz. Alkohol für 24 Stunden, schliesslich 95 proz. Alkohol. Später

kann man das Blastoderm oder den Embryo mitsamt dem Periblast von der Dotterkugel abheben."

3. Sublimat-Eisessig in folgenden drei Modifikationen: a) konzentrierte wässerige Sublimatlösung 80, Eisessig 20. Die Eier bleiben darin 45 Minuten. Das Fixationsmittel wird nach den ersten 5 Minuten gewechselt, dann in 30 proz., 50 proz., 70 proz., 80 proz. Alkohol. In letzterem werden die Keime aus der Schale freipräpariert (Böhm und Oppel). b) In der erwähnten Sublimat-Eisessigmischung verweilen die Eier nur $^1/_2$ Minute; sie kommen dann in eine Sublimatlösung von nur 5 % Eisessiggehalt auf 45 Minuten. Nun in 70 proz. Alkohol mit etwas Jod auf 45 Minuten. Dann Abschneiden des Keimes (Böhm und Oppel). c) Harrison fixiert in einer in 5 proz. Essigsäure gesättigten Sublimatlösung.
4. Die Methode von H. Virchow (publiziert von Kopsch, Behrens, Sobotta): Dieselbe zeichnet sich durch ihre Eleganz und die Schönheit der Präparate vor allen anderen aus. Sie besteht in folgendem: a) Die Eier kommen in 2 ‰ wässerige Chromsäurelösung, die bis zu $^1/_5$ ihres Volumens Eisessig enthält[1]), auf 2 Minuten (bis der Keim trüb wird), dann sofort in b) 2 ‰ Chromsäurelösung, wässerig, ohne Eisessig auf ungefähr $1^1/_2$ Stunden. c) Öffnen des Eies in physiologischer Kochsalzlösung. Man bedient sich der Kochsalzlösung, weil der Dotter in derselben keinen Niederschlag bildet, während in Wasser ein Eiweisskörper, Ichthin (Merk), ausfällt. Man befreit den Keim dadurch vom Dotter, dass man den letzteren mit einer Pipette vorsichtig abbläst. d) Einlegen des Keimes auf 1 bis 2 Stunden in Pikrin-Schwefelsäure oder Pikrin-Sublimat. Statt dieser beiden Mittel kann man auch jedes andere Fixierungsmittel anwenden. So gebrauchen Swaen und Brachet sowohl Sublimat-Eisessig (Sublimat 95, Eisessig 5) wie Sublimat-Pikrinsäure (konz. Sublimat 90, konz. Pikrinsäure 10) und Kopsch konz. wässerige Sublimatlösung und Chrom-Osmium-Essigsäure.

---

[1]) Meist löst man: Chromsäure 1, Wasser 450, Eisessig 50.

5. Methode von H. Blanc. Die Eier kommen in folgende Mischung

konz. Pikrinsäure	100
Schwefelsäure	2
Eisessig	8
Wasser	600.

Darin bleiben sie mehrere Stunden; dann Öffnen des Eies in 10proc. Essigsäure und Freipräparieren des Keimes durch Abblasen des Dotters mit Hülfe einer Pipette.

6. Goronowitsch bediente sich zum Studium der äusseren Form folgender Methode: Die Eier kommen in a) 5proz. Salpetersäure bis der Embryo durch die Eihülle hindurch sichtbar wird, was meist nach 3 Minuten eintritt. b) 5proz. Alaunlösung für 1 Stunde. Hierin wird der Dotter durchsichtig, nur der Embryo bleibt weiss. Halbiert man nun das Ei in dieser Alaunlösung, so wird nach und nach der Dotter aufgelöst. Zur Aufbewahrung der Keimscheiben verwendet Goronowitsch eine 10proc. wässerige Glyzerinlösung, der etwas Sublimat zugesetzt war. Zur Anfertigung von Schnittpräparaten brachte derselbe Autor die Eier in Kleinenberg'sche Flüssigkeit und präparierte 10 Minuten nach dem Einlegen, wenn der Embryo sichtbar wird, die Eihülle ab, dann Alkohol.

7. Kollmann fixiert die Eier in

Kaliumbichromat	5
Chromsäure	2
Salpetersäure	2
Wasser	100

für 12 Stunden. Dann in Wasser; hier Entfernen der Hüllen. Dann 70proz. Alkohol.

8. Kowalewsky fixiert mit einer Mischung von Chromsäure und Pikrin-Schwefelsäure (Pikrin-Schwefelsäure 8, 1proz. Chromsäure 1); Fixationsdauer $1^{1}/_{4}$ Stunde; dann ganz langsam steigender Alkohol (Carassius aur. Polyacanthus virid., Teleskopen).

Carassius Polyacanthus Teleskopen

9. Henneguy legt die Forelleneier 10 Minuten in Pikrin-Schwefelsäure 100, Eisessig 10, und öffnet das Ei in Wasser 100, Eisessig 10 und präpariert hierin den Embryo aus.

Dieser kommt dann in Kleinenberg'sche Flüssigkeit für einige Stunden; dann Alkohol. Diese Methode ist besonders für schon etwas weiter entwickelte Stadien brauchbar.

10. Olt bringt die Eier des Bitterlings in 3proz. wässerige Salpetersäure auf 3 Minuten, dann in 5proz. Alaunlösung und in Wasser. — Bitterling

11. Kupffer fixiert bei Acipenser sturio die Eier mit einer Mischung von Sublimat und Chromsäure und rühmt dieses Gemisch besonders deshalb, weil sich in ihm die Eier leicht von ihren Schleimhüllen befreien lassen. — Acipenser

12. Für pelagische Fischeier sind folgende Methoden geeignet, die nach Lee und Mayer p. 308 zitiert sind, a) Methode von Withmann: Man verwendet zuerst $^1/_2$ proz. Osmiumsäure-Seewasser aa für 5—10 Minuten, darauf das Gemisch von Merkel (nach Eisig) für 1—2 Tage. Anstechen der Eikapsel, Alkohol. b) Methode Collinge: Dem Meerwasser, das die Eier enthält, werden auf je 30 ccm 3—4 Tropfen einer mit 5 % Salzsäure versetzten konz. Pikrinsäure hinzugefügt. Hierin bleiben die Eier unter Umrühren 3 Minuten. Dann Wasser und: Kampferspiritus 1, 2proz. Essigsäure 4, Alkohol 4. c) Methode Raffaele: Fixation entweder mit dem Gemisch von Hermann oder dem Sublimat von Mingazzini. d) Die Methode von Heinke und Ehrenbaum: Formol 1, Seewasser 39. — Pelagische Fische

13. Die Eier der Muraenoiden fixiert Boeke nach Child und Summer entweder in Sublimat mit 5 % Eisessig oder in Zenker'scher Flüssigkeit für kurze Zeit; bringt sie dann in 10proz. Formol und nach einigen Stunden in die Alkoholreihe von Alkohol von 30 % angefangen. Bei dieser Methode behält der Dotter eine gute Schnittkonsistenz; das gilt aber nur für pelagische Teleostier-Eier. — Muraenoiden

b) Einige besondere Methoden — Färbung mit Boraxkarmin-Jodgrün

Einige besondere Methoden. Färbung der jungen Teleostiereier mit Boraxkarmin-Jodgrün (Felix): Man färbt in gewöhnlicher Weise mit Boraxkarmin durch, differenziert mit Salzsäure-Alkohol und entfernt die Säure sorgfältig durch Waschen in 70proz. Alkohol. Nun kommt das Material in folgende Lösung: 2 g Jodgrün werden in 100 ccm 50proz. Alkohol gelöst.

Die Objekte bleiben hierin 12—24 Stunden und werden dann solange in 70proz. Alkohol gewaschen, bis die grüne Farbe verschwindet und die ursprüngliche rote wieder erscheint.

c) Stückfärbung mit Hämatoxylin

Stückfärbung des mit der Methode von H. Virchow behandelten Materiales mit Hämatoxylin (Sobotta). Die Objekte kommen in 1. Aq. dest. bis sie untersinken, 2. für kurze Zeit in 5proz. Alaunlösung, 3. in unverdünntes oder zur Hälfte mit Alaun verdünntes Hämatoxylin (Boehmer) für 1—24 Stunden, 4. in 5proz. Alaunlösung zur Differenzierung.

d) Trockenpräparate

Zur Anfertigung von Trockenpräparaten der nach der Methode von H. Virchow behandelten Eier verfährt man in genau derselben Weise, wie es für die Amphibien auf Seite 161/162 auseinandergesetzt ist.

e) Durchsichtige Flächenpräparate nach Kopsch

Durchsichtige Flächenpräparate. Zur Herstellung derselben verfährt I. Kopsch folgendermassen: Die Objekte sind nach der Methode von H. Virchow fixiert; sie werden 24 Stunden in Boraxkarmin 1, HCl-Alkohol 10 gefärbt und dann in toto in Kanadabalsam eingeschlossen.

nach Corning

II. Corning fixiert zur Untersuchung der Merocyten auf Flächenpräparaten die Eier in einer Mischung von gleichen Teilen konz. Sublimat, Aq. dest., 1proz. Platinchlorid, öffnet die Eihaut in physiologischer Kochsalzlösung und färbt später mit Alauncochenille, differenziert mit HCl-Alkohol oder mit Alkohol + Prikrinsäure.

bei Belone

Die Untersuchung der durchsichtigen Eier von Belone muss nach Kopsch vermittelst des Durchströmungskompressoriums von Ziegler vorgenommen werden. Der angewandte Druck darf nur gering sein.[1])

B) Ältere Entwicklungsstadien

B. Fixation für ältere Entwicklungstadien. Man präpariert durch Sprengung der Eihaut in physiologischer Kochsalzlösung die Embryonen frei und bringt sie in die Zenker'sche Fixierungsflüssigkeit, die nach Felix für alle Fragen, mit Ausnahme der Untersuchung des Centralnervensystems, glänzende Resultate ergibt. Um eine Krümmung der Embryonen bei der Fixation zu vermeiden, legt man sie auf einen Hornspatel und taucht erst den

[1]) Kopsch („Gastrulation und Embryobildung bei den Chordaten" Leipzig 1904 p. 39) durchleuchtet Forelleneier, indem er sie in einem trichterförmig durchbohrten Korkstückchen auf den Objekttisch eines mit Abbé'schem Beleuchtungsapparat versehenen Mikroskopes bringt, bei dem der Tubus entfernt ist.

Kopf, dann nach und nach den Rumpf in die Zenker'sche Lösung. Mayer führt die Streckung der Fischembryonen auf andere Weise herbei. Er schiebt die Tiere, wenn sie im Sterben liegen, mit dem Schwanz zuerst in den keilförmigen Raum zwischen zwei Glasklötzen, die im Fixierungsmittel stehen. Seine Methode ist ursprünglich für Selachier ersonnen, doch ist sie auch für andere Fische gut anwendbar.

Beim Schneiden macht der Dotter im Dottersack oder Darm Schwierigkeiten. Um ihn bei ausgeschlüpften Embryonen ganz zu entfernen, schneidet Felix bei Tieren mit Dottersack letzteren an und lässt dieselben eine Zeit lang in physiologischer Kochsalzlösung herumschwimmen. Ist äusserlich der Dottersack verschwunden, so liegt doch noch (beim Lachs) bis gegen Ende des 3. Monates nach dem Ausschlüpfen Dotter in der Leibeshöhle; ihn entfernt man dadurch, dass man den Tieren den Bauch öffnet und sie für einige Minuten in 0,75 proz. Kochsalzlösung legt.

a) Fixation

Andere Fixationsmittel als die erwähnte Zenker'sche Flüssigkeit sind:

1. folgende Sublimat-Eisessiggemische: a) konz. wässerige Sublimatlösung 95, Eisessig 5. b) Sublimat-Eisessig in Verbindung mit Formalin. Die Eier kommen in Sublimatlösung 100, Eisessig 10 für 1 Minute; dann in 10 proz. Formalin. Vergl. Seite 145, Boeke für Muraenoiden. **Muraenoiden**
2. Pikrin-Schwefelsäure (Kleinenberg), sie ist nach Holt besonders für die Untersuchung des Centralnervensystems geeignet. Vergl. auch die Methode von Henneguy auf Seite 144/145.
3. Salpetersäure in folgender Anwendung: a) 10 proz. Salpetersäure. Die Eier kommen auf 1/4 Stunde in 10 proz. Salpetersäure; wenn der Embryo weiss geworden ist, sprengt man die Eihülle und bringt den Embryo für 1 Stunde in 10 proz. Salpetersäure; dann für mehrere Sekunden 1—2 proz. Alaunlösung, dann Alkohol (Rabl-Rückhardt); siehe auch die Methode von Goronowitsch auf Seite 144. b) 3 proz. Lösung einer konz. Salpetersäure in konz. Sublimat. Für ältere Embryonen von Salmo und Carassius. Die Flüssigkeit fixiert und entkalkt zugleich (Nusbaum-Prymak). c) Eine **Salmo** **Carassius**

andere Kombination zwischen Salpetersäure und Sublimat ist eine Mischung von konz. Sublimat und 3proz. Salpetersäure aa (Nusbaum-Sidoriak).

Bitterling

Cymatogaster

4. Hermann'sche Flüssigkeit mit Reduktion in Holzessig (Embryonen des Bitterlinges nach Olt).
5. Flüssigkeit von Perényi für die Larven von Cymatogaster (Eigenmann).

Literatur zu Kapitel 8.

Ballowitz (Enzyklopädie I, p. 226—228). — Burchardt (Jen. Zeitschr. f. Naturw. Bd. 34, 1900). — Hatschek (Arb. Zool. Institut Wien Bd. 4, 1881). Morgan u. Hagen (Journ. of Morph. vol. XII, 1900). — Samassa (Arch. f. Entwicklungsmech. Bd. VII). — Sobotta (Arch. mikr. Anat. Bd. 50). — van der Stricht (Bull. Acad. roy. Belg. Sér. 3, Bd. 30) und (Arch. Biol. Bd. 14, 1896). — Ziegler (Lehrbuch d. Entwickelungsgeschichte, Jena 1902).

Lubosch, Zeitschr. f. Fischerei, Jahrg. 9, H. 3. — Herfort, Arch. mikr. Anat. Bd. 57, 1900. — Owsiannikow, Mém. l'Acad. St. Pétersb. 7. Sér., T. 33. — Ballowitz, „Enzyklopädie" Bd. 1. — Hatta, ref. nach Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. 10. — Kupffer, Arch. mikr. Anat. Bd. 35, 1890. — Böhm, Arch. mikr. Anat. Bd. 32.

Ballowitz, Embryolog. Technik. Enzyklopädie I. — Behrens, Anat. Hefte, Heft 32, 1898. — Blanc, Ber. naturf. Gesellsch. Freiburg i. B. Bd. 8, 1894. — Böhm u. Oppel, Taschenbuch, Aufl. III und IV. — Corning, Festschrift f. Gegenbaur Bd. 2, 1896. — Eigenmann, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 4. — Felix, Anat. Hefte 8, 1897. — Goronowitsch, Morph. Jahrb. Bd. 10, 1884. — Harrison, Arch. mikr. Anat. Bd. 46, 1895. — Holt, Zool. Jahrb. Abtlg. Anat. Ontog. Bd. 4, 1890. — Kollmann, Arch. Anat. Physiol., Anat. Abtlg., 1885.[1] — Kopsch, Arch. mikr. Anat. Bd. 51; Intern. Monatsschr. Anat. Physiol. 1899/1901; Sitz.-Ber. Gesellsch. naturf. Freunde, Berlin 1902, No. 2. — Kowalewsky (Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 48). — Kupffer (Sitz.-Ber. d. Gesellsch. f. Morphol. u. Physiol. München Bd. 7, 1891; München u. Leipzig [Lehmann] 1893). — Lee u. Mayer („Grundzüge", Berlin 1901). — Merk, Sitz.-Ber. Akad. Wiss. Wien. math.-naturw. Kl., 3. Abtlg. 1886. — Nusbaum-Prymak, Anat. Anz. Bd. 19. — Nusbaum-Sidoriak, Arch. Entwicklungsmech. Bd. 10. — Olt, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 55. — Rabl-Rückhardt, Arch. Anat. Physiol., Anat. Abtlg, 1882. — Sobotta, Anat. Hefte Bd. 19, 1902. — Swaen u. Brachet, Arch. Biol. T. 16, 1900. — H. E. Ziegler, Lehrbuch 1902, Jena.

[1] Cit. nach Lee u. Mayer, pag. 308.

Kapitel 9

Amphibien

Laichzeiten

Laichzeiten. Rana fusca: Ende Februar, Mitte oder Ende März. Rana escul.: Ende April bis Mitte Juni. Rana temp.: Ende April bis Ende Mai. Triton alp.: März bis Mai; Triton crist.: April bis Juni. Triton taen.: Mai bis Juni (Böhm u. Oppel). Bufo vulg.: März bis April. Bufo calam.: Mai bis Juni. Bufo var.: April. Pelobates: April. Alytes: Frühjahr und Herbst. Bombinator ign.: Mai, Juni, Juli. Je nach der Temperatur hat Bombinator mehrere aufeinander folgende Laichperioden in einem Jahr. Man kann laichreife Weibchen und Laich von April bis Juli finden (Pflüger nach Born); von Hyla arb. gibt Thon an, dass sich in Böhmen der Laich von Mai bis August findet. Das jüngste Entwicklungsstadium, das er zu Gesicht bekam, befand sich auf dem Blastulastadium. Bei Salamandra erstreckt sich die Zeit der Begattung nach Leydig über den ganzen Frühling und Sommer. Die Verhältnisse variieren ausserordentlich je nach den Gegenden, aus denen das Material stammt. Daher kann man in jedem Monat frühe und späte Entwicklungsstadien antreffen. Die Larven werden meist im Frühjahr geboren. Vom Rath gibt an, dass die Embryonen oft im September ihre volle Grösse erreicht haben. Entnimmt man sie dem Muttertier, so kann man sie auch im Winter in kleinen Aquarien lebend halten. Als solche sind am zweckmäfsigsten weisse Porzellan- oder Steingutgefässe, die in einem warmen Raume stehen, weil dadurch die Larven leicht gebleicht werden. (Häcker.) Bei Salamandra atra treten jederseits 40—60 Eier in den Eileiter resp. Uterus, meist aber kommt nur das unterste zur Entwicklung. (Wiedersheim).

Stadien der Eireifung

Stadien der Eireifung. Bei Rana und Bufo fällt die Eireife mit dem Ende des Winterschlafes zusammen. Die letzten Reifungsstadien und die Ausstossung der Polkörperchen gehen dem

Laichen unmittelbar vorher; bei Rana dauert der Durchtritt durch den Eileiter 12 Stunden; daher sind hier die reifen Stadien in verschiedenen Höhen der Geschlechtswege verschieden. Bei Bufo haben die Eier keinen längeren Aufenthalt im Ovidukt. Bei Bufo cal., Alytes, Bombinator, den Urodelen erfolgt die Eireifung während der Laichzeit (Carnoy und Lebrun). Bei Triton taen. findet die Reifung der Ovarialeier schubweise statt (Born). Man bekommt alle wichtigen Stadien, wenn man während der Laichzeit möglichst viel Weibchen gleich nach der Gefangennahme tötet. In der Gefangenschaft verschwinden die Endstadien schon nach 24 Stunden. „Man kann sich aber auch noch auf zwei andere Arten kontinuierliche Entwicklungsreihen verschaffen: man sammelt entweder Tiere vom Larvenstadium bis zum Eintritt der ersten Geschlechtsreife oder aber Tritonen vom Ende einer Brunstperiode bis zum Beginne der nächstjährigen“ (Born). Bei den Endstadien der Eireifung schimmert das Keimbläschen dicht unter der Oberfläche des dunklen Poles als heller Fleck hindurch (O. Hertwig bei den Anuren, Born bei den Urodelen).

Künstliche Befruchtung

1. Befruchtung auf nassem Wege

Rana fusca

Künstliche Befruchtung. Man nimmt die künstliche Befruchtung entweder auf nassem oder trockenem Wege vor. Befruchtung auf nassem Wege. Als Beispiel wähle ich Rana fusca. Man tötet ein Männchen und sieht nach, ob die Samenblasen prall gefüllt sind. Ist das der Fall, so benutzt man den Inhalt derselben; sonst kann man auch die Hoden unter Wasser zerschneiden und das so erhaltene Sperma in eine zweite Schale von den Hodenstückchen abgiessen. In beiden Fällen muss man sich unter dem Mikroskop von der Beweglichkeit der Spermatozoen überzeugen, anderenfalls taugt der Samen nichts. Nun entnimmt man dem Weibchen aus dem vorsichtig ohne Quetschung der Eier geöffneten Uterus die Eier mit Hilfe eines absolut trockenen Glasstabes oder Spatels und bringt sie unter seitlichen Bewegungen (Roux) in die Schale mit Sperma. Nach 6—10 Minuten giesst man dann den Samen ab und bedeckt die Eier mit mehrmals erneuertem frischen Wasser. Zweckmäfsig ist es, unter die Eiballen Stückchen von Hollundermark zu legen, um sie schwimmend zu erhalten (O. Hertwig) und die den Eiern anhaftende Luft abzupinseln (Roux). Sind die Eier eines Weibchens trüb und milchig, so sind sie zur Befruchtung ungeeignet ebenso, wenn sie vor der Besamung längere Zeit gestanden haben oder mit

Wasser in Berührung gekommen sind. Spätestens eine Stunde nach dem Abgiessen des Samens müssen sich die Eier mit den weissen Polen nach abwärts gedreht haben, sonst ist die Befruchtung missglückt (Roux). Die erste Furche tritt auf 2—3 Stunden nach der Besamung. Befruchtung auf trockenem Wege. Triton taen. (O. Hertwig). Die günstigste Jahreszeit zur Vornahme der Befruchtung ist Mai bis Juli. Man tötet das frisch eingefangene Weibchen und präpariert die Eileiter frei. In jedem befinden sich ungefähr 10 reife unbefruchtete Eier. Man zerschneidet in einer trockenen Schale die Ovidukte und befreit die Eier sorgfältig von den ihnen anhaftenden Eileiterresten, unter Umständen mit Hilfe der Lupe. Nun tötet man ein Männchen und sucht sich schnell die Vasa def. auf, die prall gefüllt sein müssen. Diese werden abgeschnitten und mit dem heraustretenden Inhalt befeuchtet man jedes einzelne Ei, indem man mit dem Samenleiter über dasselbe hinstreicht. Die nunmehr besamten Eier kommen auf eine halbe Stunde in die feuchte Kammer, dann übergiesst man sie mit frischem Wasser, das man mehrmals erneuert und löst die am Boden der Schale festklebenden Eier ab.

2. Befruchtung auf trockenem Wege Triton taen

Überfruchtung. Bei Fröschen führte O. Hertwig Überfruchtungen auf zwei Weisen herbei: 1. Die mit Eiern gefüllte Gebärmutter wurde herausgenommen und für 2—4 Tage in die feuchte Kammer gelegt; dann werden die Eier künstlich befruchtet. 2. Die Froschpärchen werden getrennt und Männchen und Weibchen 4—6 Wochen isoliert gehalten. Hierdurch kommen die Eier in ein Stadium der Überreife.

Überfruchtung

Furchungsstadien beschafft man sich entweder dadurch, dass man die Tiere ablaichen lässt oder durch künstliche Befruchtung. Der Laich ist beim Frosch scheibenförmig, bei der Kröte wird er in Schnüren abgelegt. Triton klebt die Eier an Wasserpflanzen an und knickt nach der Beobachtung von Michaelis immer die Blätter oder Gräser, die sich im Wasser befinden, um das Ei herum. Dadurch wird das Aufsuchen der Eier im Aquarium erleichtert. Bei Hyla arb. liegen im Laich höchstens 30—40 Eier, meistens nur 6—15 zusammen; sie sind so gross wie die von Rana und Bufo. Der animale Pol der Blastula ist leicht gelb bis braun, der vegetative Pol weisslich oder leicht gelblich. Der Laich befindet sich nahe dem Boden der Tümpel an verschiedenen Wasserpflanzen befestigt (Thon).

Furchungsstadien

Pflege und Aufzucht

Pflege und Aufzucht. Um bei dem Axolotl mehrmals im Jahre in der Gefangenschaft befruchtete Eier zu erhalten, gibt Semper folgendes Mittel an. Man hat einen grossen Stamm mindestens 2jähriger Tiere. Sie werden (10—12 Tiere zusammen) in kleinen irdenen Schalen von 16—20 cm Durchmesser ohne Sand und Pflanzen mindestens 4 Wochen lang gehalten. Man sorgt peinlich dafür, dass das Wasser rein ist und ebenso für gute Fütterung. Will man sie zum Laichen bringen, so setzt man 2—3 Pärchen in ein grosses Aquarium mit Pflanzen und Sand, durch welches ein mäſsig starker Strom geht. Sehr bald werden dann die Tiere laichen. Man darf aber ein und dieselben Tiere nicht öfter als 2 mal im Jahre auf diese Weise zum Laichen bringen und ebenso sie erst dann wieder in die Schalen zurücksetzen, wenn das Laichgeschäft wirklich beendigt ist. In ähnlicher Weise hebt O. Schultze sein Froschmaterial auf. Die Frösche werden nach Schmelzen des Wintereises gefangen, „nach Geschlecht in kalter Dunkelheit isoliert gehalten und nach Bedürfnis in einem Bassin im Freien zur Umarmung zusammengebracht.“ Zur Fütterung der Larven von Rana escul. hängt Born zerschnittene Froschlarven in die Aquarien hinein; sie werden von den lebenden Larven benagt. Oder er liess sich aus getrocknetem, zerriebenen Fleisch mit etwas Zucker oder aus käuflichem Fischfutter Pastillen pressen. Diese werden in den Sand des Aquariums gesteckt, zerfallen durch die Feuchtigkeit desselben rasch und werden gern genommen. Tritonen und Larven von Salamandra ernährt man anfangs mit Würmern wie Tubifex rivul. (Häcker), später am besten mit Regenwürmern. Ebenso ältere Axolotllarven: letztere kann man auch direkt füttern, wenn man ihnen die Fleischstückchen unmittelbar vor den Mund hält. Sind sie ausgewachsen, so können sog. Futterfische als Futter dienen.[1]) „Um Salamandra masculosa im Winter aufzubewahren, empfiehlt Pfitzner eine grosse flache Holzkiste in einen trockenen Keller auf hohe Unterlagen zu stellen und den Boden mit einer 15—20 cm hohen Schicht recht groben Kieses zu bedecken, worauf eine ebenso hohe Schicht trockenen Waldmooses kommt. In der Mitte wird eine flache Schale mit Wasser aufgestellt. Die Kiste wird mit einem Deckel verschlossen, in dessen Mitte ein Loch von etwa 45 cm im

1) Ganz junge Axolotllarven füttert man mit Daphnien.

Geviert der Luft freien Zutritt gewährt. In diesem Behälter können die Tiere ohne Nahrung überwintern.“ (Häcker p. 4 Anm.)

Entfernung der Eihüllen

Entfernung der Eihüllen. Die Entfernung der Hüllen der Amphibieneier kann auf mechanischem oder chemischem Wege erfolgen. Wenn man den ersteren einschlägt, so nimmt man die Abpräparation am besten vor der Fixation oder allenfalls nach derselben im Wasser vor. Man fasst das in seiner Hülle befindliche Ei mit einer möglichst feinen und scharfen Pinzette und schneidet von der Hülle eine recht grosse Kuppe mit einer scharfen Schere ab, natürlich ohne das Ei zu verletzen. Durch einen sanften Druck mit der Pinzette auf den zurückgebliebenen Teil der Hülle, der das Ei enthält, treibt man das letztere durch den Einschnitt hinaus. Das Ei ist elastisch; eine während des Hinaustretens stattgefundene Formveränderung verschwindet rasch. Nach der Fixation hat das Ei seine Elastizität verloren und aus diesem Grunde ist bei einem fixiertem Ei die Entfernung der Hülle ohne Verletzung des Eies viel schwerer. Born befreit die Larven von Rana escul. unter physiol. Kochsalzlösung von ihren Hüllen und sammelt sie zur späteren Verwendung in reiner physiol. Kochsalzlösung. Braus legt das (nicht fixierte) Tritonei auf ein Stück Klemmleber und sticht eine feine Insektennadel durch die Hülle hindurch. Nun fährt er mit einem scharfen Rasiermesser an der Nadel entlang und schneidet dadurch ein grosses Stück der Hülle ab. Das Ei tritt danach oft von selbst aus der Hülle heraus. Für die chemische Entfernung der Gallerthülle kommen in Betracht: 1. Natriumhypochlorit (Eau de Labarraque); 2. Kaliumhypochlorit (Eau de Javelle). Angegeben von Whitmann und Blochmann. Die Eier sind fixiert; werden dann ausgewaschen und kommen aus dem Wasser in das Lösungsmittel der Gallerte. Von Natriumhypochlorit verdünnt man eine 10proz. wässerige Lösung mit 5—6 Teilen Wasser und lässt die Eier so lange darin, bis sie aus ihren Hüllen herausfallen. Dann vorsichtiges aber gründliches Waschen mit Wasser. Dasselbe gilt von Eau de Javelle; doch nimmt man da eine 3—4fache Verdünnung. Sehr oft werden, besonders beim Eau de Javelle, die Eier brüchig und platzen, so dass man immer mit mehr oder weniger grossem Verlust an Material zu rechnen hat. Ebenso wird in den äussersten Schichten des Eies das Pigment häufig zerstört. Lee und Mayer (p. 304) empfehlen zur Entfernung der Hüllen das Einlegen

in eine 1 proz. Chromsäure 2—3 Tage und häufiges Schütteln. Aber auch dadurch werden die Eier brüchig. Lee endlich entfernt die Gallerte durch mehrtägiges Einlegen in Gilson's Sublimatgemisch. (Lee u. Mayer p. 47.)

Männl. Geschlechtsorgane

1. Spermatozoen

Männliche Geschlechtsorgane. Spermatozoen. Zum Studium der reifen Spermatozoen nimmt Meves das Sperma aus dem Vas def. und stellt damit Ausstrichpräparate her; diese wurden dann mit 1 proz. Osmiumsäure fixiert und 24 Stunden lang mit Gentianaviolett gefärbt.[1]) Die Spermien von Bombinator ign., die nach Broman sehr wenig resistent sind, behandelt derselbe Forscher, wie folgt: Die Samenflüssigkeit wird mit Humor aqueus desselben Tieres verdünnt, auf Deckgläschen ausgestrichen, ohne aber einzutrocknen. Dann setzt man sie starken Osmiumdämpfen aus. Nach $^1/_2$—2 Minuten kommt das Deckgläschen auf den Objektträger auf einen Tropfen Wasser. Nach einigen Minuten entfernt man das Wasser durch Absaugen und ersetzt es durch Gentianaviolettlösung. Oder man fixiert nicht, sondern setzt gleich zu der ausgestrichenen verdünnten Samenflüssigkeit Gentianaviolettlösung; dann zieht man mit Wasser aus und lässt trocknen. Verschiedene Stoffe liess Neumann auf die Spermatozoen vom Frosch und Salam. mac. einwirken, nämlich: physiol. und 10 proz. Kochsalzlösung, Lugol'sche Lösung, Natrium = Magnesiumsulfat, Borax, Natriumbikarbonat, Sublimat, Alaun, Zucker.

Bombinator

Nach Analogie der Blutpräparate kann man den ausgestrichenen Samen (z. B. von Triton) durch mäfsiges Erwärmen fixieren und nachher färben. Als Färbungsmittel dient Gentianaviolett nach der Gram'schen Methode, Hämatoxylin (Boehmer) und Ehrlich-Biondi. Nach der Beobachtung von Fick beim Axolotl bekommt man bei Anwendung der Weigert'schen Eisenhämatoxylinfärbung auf die durch Hitze oder mit Sublimat fixierten Spermatozoen eine isolierte Färbung des Mittelstückes. Man beizt mit einer 1 proz. Lösung entweder von schwefelsaurem Eisenammonoxyd oder von Eisenchlorid, Eisensulfat, Kupfersulfat, wäscht mit Wasser ab und bringt das Präparat auf 12 Stunden in die Hämatoxylinlösung. Differenzierung unter dem Mikroskop in der vorher angewandten Beize. Eine isolierte Färbung des Mittelstückes erhielt Neumann

Axolotl

[1]) Fick fixiert beim Axolotl mit erwärmter Sublimatlösung.

durch Zusatz einer Hämatoxylinlösung (Sol. Extr. Campechiani und Alaunlösung) zum frischen Sperma.

2. Hoden

a) Wahl des Materiales

Hoden. Nach Meves finden sich im Hoden von Salamandra Amitosen reichlich im März, Mitosen häufig im Herbst. Zum Studium der Zellteilungen und der Attraktionssphäre bei Salamandra nimmt Rawitz den Hoden aus den Monaten Juni, Juli, August. Die weissen Hodenballen von Salamandra enthalten nach Leydig und Flemming fertige Spermatozoen, die grau durchscheinenden Spermatocyten in Teilung. Zum Studium der Umbildung des Spermatiden in Spermatozoen nimmt man den Salamanderhoden aus dem Monat September oder Oktober und zwar die Grenzpartieen der weissen und grauen Läppchen (Häcker).

b) Isolationspräparate

Zerzupfungspräparate der grauen Hodenballen von Salamandra fixiert Flemming durch Aufträufeln von 5fach verdünnter Chrom-Essig-Osmiumsäure. Das Präparat bleibt mit dem Fixierungsgemisch mehrere Stunden in der feuchten Kammer, wird dann ausgewaschen und gefärbt.

c) Fixation

Zur Fixation der ganzen Hoden kommen folgende Mittel in Betracht.

1. Chrom-Osmium-Essigsäure nach Flemming, sowohl starke wie schwache Mischung.
2. Platinchlorid-Osmium-Essigsäure nach Hermann. In diesen Gemischen bleibt das Material entweder 24 Stunden oder mehrere Wochen und selbst Monate (Meves).
3. Pikrin-Osmium-Essigsäure und Pikrin-Sublimat-Osmium-Essigsäure nach Vom Rath.
4. Platinchlorid-Pikrin-Osmium-Essigsäure. Salamandra mac. In dieses Fixationsmittel kommen die Hoden in toto, werden dann nach einiger Zeit mit einer feinen Insektennadel durchstochen, um das Eindringen der Flüssigkeit zu erleichtern. Nach 3—5 Tagen Abspülen mit Methylalkohol und Einlegen in abs. Alkohol, der mehrmals gewechselt wird (Vom Rath).
5. Pikrin-Sublimat-Essigsäure.
6. 70proz. Alkohol, dem man auf 2 Teile 1 Teil Eisessig zufügt (Mc. Gregor für Amphiuma).
7. Zenker.

8. Kaliumbichromat-Eisessig (Tellyesniczky).
9. Sublimat.
10. Sublimat-Eisessig.
11. Sublimat-Essigsäure nach Drüner, allein oder mit Zusatz von Osmiumsäure.
12. Sublimat-Alkohol-Eisessig (v. Lenhossék).
13. Alkohol-Chloroform-Eisessig.
14. Osmiumchlorid in Lösung von $^1/_2$—$^1/_{10}$ %.
15. Iridiumchlorid-Essigsäure für 3—12 Stunden; dann Auswaschen in Wasser für 1 Stunde. Alkohol. Die letzten beiden Fixative empfiehlt Eisen für Batrachoseps.

d) Färbung

Färbung. Nach der Fixation mit den Osmiumgemischen: Behandlung der ganzen Stücke mit rohem Holzessig. Ferner Färbung mit Safranin, Gentianaviolett, allein oder nach dem Verfahren von Gram, Safranin-Gentiana-Orange nach Flemming oder nach der Hermannschen Modifikation, Alizarin nach Rawitz, Durchfärbung mit Hämatoxylin nach Heidenhain und Nachfärben der Schnitte mit Safranin (Drüner), Eisenhämatoxylin nach Heidenhain (dasselbe nach Peter siehe Seite 136), Methylgrün-Säurefuchsin nach Auerbach, Bleu de Lyon-Boraxkarmin zur Durch- oder Schnittfärbung nach Drüner, Ehrlich-Biondi, Ehrlich-Biondi mit der saueren Behandlung nach Drüner, Eisenhämatoxylin nach Benda, kombiniert mit Kongorot; Thionin-Rutheniumrot.

Weibl. Geschlechtsorgane Fixation

Weibliche Geschlechtsorgane. Zur Fixation muss man nach Born den Ovarialsack unter physiologischer Kochsalzlösung seiner ganzen Länge nach öffnen und es dürfen nur kleine Stücke in die Fixierungsflüssigkeit kommen. Für die Anfangs- und Endstadien der Eireifung wendet er bei Triton Sublimat-Eisessig, für die anderen Stadien eine auf 80—90° erwärmte $^1/_3$ proz. Chromsäurelösung an. Das Material kommt in die heisse Flüssigkeit, die sich allmählich abkühlt, und bleibt in derselben 2 Tage. Dann Auswaschen in Wasser; Alkohol. Nach Levi ist die Erwärmung auf 85° zu hoch; er erhitzt die Chromsäurelösung nur bis 70° und erzielt damit eine ebenso gute Fixation, aber eine bessere Färbbarkeit. Mit Chrom-Essigsäure und mit einer Mischung von Sublimat und Chrom-Essigsäure erhält man nach Born nur bei den grösseren Eiern bis zu 0,3 mm Durchmesser herab gute Resultate. Für das Salamanderovarium empfiehlt Levi ganz besonders die Her-

mann'sche Flüssigkeit. Carnoy und Lebrun gebrauchen hauptsächlich das Gilson'sche Sublimatgemiseh, in welchem die Objekte 15 Min. bis 1 Stunde bleiben; dann Auswaschen 1 Stunde, Alkoholreihe bis zum 80 proz. Alkohol. Über heisse Chromsäure, Gilson'sches Sublimatgemisch, Flemming'sche Flüssigkeit als Fixierungsgemisch für das unreife Tritonei sagt Lubosch: Die Chromsäure fixiert am besten, erschwert die Färbbarkeit am meisten, die Flemming'sche Flüssigkeit fixiert am wenigsten zuverlässig, erleichtert aber die Färbbarkeit am meisten. Das Gilson'sche Gemisch steht in der Mitte; es gibt, „vorsichtig angewandt, bei guter Färbbarkeit auch die Formen der Eier gut wieder". Junge und mittlere Stadien werden in ihm am besten erhalten bei einer Fixationsdauer von 10—30 Minuten; dann fliessendes Wasser 4—24 Stunden, Alkohol. Auerbach fixiert das Ovarium von Rana und Triton in folgendem Sublimat-Alkoholgemisch: Sublimat 4, Wasser 76, Alkohol 20. Nicht befruchtete, aber normal abgelegte Eier von Salmandra perspic. fixiert Rossi ausser in dem Sublimat nach Mingazzini in folgender Mischung: konz. wässeriges Sublimat 100, konz. wässerige Pikrinsäure 100, Eisessig 5, Aq. dest. 200. Eierstockeier von Siredon behandelt Häcker nach der Flemming'schen Methode: 1. 14 Tage mit $^1/_4$ proz. Chromsäure, 2. Auswaschen in Wasser; dann Alkohol.

Befruchtete Eier
1. Fixation

Befruchtete Eier. Geeignete Fixierungsmittel sind:

1. 1 proz. Chromsäure 1, Sublimat konz. wässerig 1, Wasser 2: Nach 24 Stunden Auswaschen in Wasser, dann Alkohol von steigender Konzentration (Rana, Triton).
2. $^1/_2$—$^1/_3$ proz. Chromsäure auf 85° erwärmt nach Born.
3. 0,5 proz. Chromsäure 100, konz. wässeriges Sublimat 100 (Adler für Bufo vulg.).
4. Konz. wässeriges Sublimat 2, 1 proz. Chromsäure 1 nach Lo Bianco: Fixationsdauer 2—4 Stunden; dann Wasser, Alkohol.
5. Chrom-Essigsäure nach O. Hertwig: Ein Gemisch von 2 proz. Essigsäure und 0,5 proz. Chromsäure.
6. Chrom-Essigsäure nach Flemming auf 80° erwärmt (Axolotl).
7. Chrom-Essigsäure nach Michaelis: $^1/_4$ proz. Chromsäure 100, Eisessig 1 (Triton).



8. Chrom-Essigsäure nach O. Schultze: 1 proz. Chromsäure 25, 2 proz. Essigsäure 5, Wasser 70. Darin 24 Stunden; dann gründliches Waschen in Aq. dest., dann Alkohol (für Rana).
9. Chrom-Essigsäure nach Fick: 1 proz. Chromsäure 25, Wasser 75, Eisessig 0,1. Die Eier mit den Hüllen verbleiben darin 24 Stunden, dann in Wasser Abpräparieren der Hülle, Alkohol (Axolotl).
10. Chromsäure-Sublimat-Eisessig nach Grönroos: konz. Sublimat 100, $^1/_2$ proz. Chromsäure 100, Eisessig 2. Eier mit den Hüllen bleiben in dem Gemisch 24 Stunden; fliessendes Wasser und Abpräparieren der Hüllen; Alkohol (Triton, Salamandra).
11. Osmium-Essigsäure nach O. Hertwig: „0,3 proz. Osmiumsäure + 0,1 proz. Essigsäure" (Rana).
12. $^1/_4$ proz. Platinchlorid + 1 proz. Chromsäure aa (Whitman für Froscheier, Fixationsdauer 1—2 Tage).
13. Chrom-Osmium-Essigsäure nach O. Schultze: 1 proz. Chromsäure 25, 1 proz. Osmiumsäure 10, Wasser 60, 2 proz. Essigsäure 5 (Rana).
14. Flemming's Chrom-Essigsäure.
15. Konz. Sublimatlösung (für Salamandra nach Grönroos).
16. Sublimat-Eisessig: konz. Sublimat 100, Eisessig 5 (für Triton nach Michaelis).
17. Sublimat-Essigsäure nach Drüner (für Triton nach Braus).
18. Pikrin-Sublimat (für ältere Stadien von Bufo vulg. nach Adler).
19. Pikrin-Essig-Sublimat (für Triton nach Michaelis).
20. Salpetersäure-Sublimat-Eisessig nach Gilson (für die Eier von Batrachier nach Lee): In dem Gemisch 15 Minuten bis 1 Stunde. Dann Auswaschen in Wasser 1 Stunde; Alkohol (Carnoy und Lebrun).
21. Formalin nach O. Schultze: Entfernung der Gallerthülle auf mechanischem Wege bis auf die innerste Schicht. Einlegen auf 5 Minuten in eine 2 proz. wässerige Formalinlösung, die auf 75—80° erwärmt ist, dann Alkohol. Man kann die Eier in der Formalinlösung lange aufheben.

22. Wasser auf 80° C. erhitzt (O. Schultze für Axolotl).
23. Heisses Wasser in Verbindung mit Chromsäure nach O. Hertwig: Wasser 90—96°, 5—10 Minuten; Entfernen der Hüllen, 0,5 proc. Chromsäure bis zu 12 Stunden.
24. Übergiessen mit auf 90° C. erhitztem Öl (Born).
25. Chrom-Essigsäure (Hertwig) in Verbindung mit Perényischer Flüssigkeit. Spemann für Triton. Die Eier kommen mit ihren Hüllen für 3 Stunden in die Chrom-Essigsäure, dann Abspülen in Aq. dest. und Entfernen der Hüllen; darauf für 20 Stunden in die Flüssigkeit von Perényi.
26. Perényi'sche Flüssigkeit. Perényi und Spemann, letzterer für ältere Stadien vom Triton: Entfernung der Hüllen, dann für 24 Stunden in die Fixierungsflüssigkeit.
27. Pikrin-Schwefelsäure (Scott und Osborn).
28. Alkoholische Pikrin-Schwefelsäure. Eine gesättigte Lösung von Pikrinsäure in 70 proz. Alkohol wird mit 2 % Schwefelsäure vermischt; da hinein kommen die Eier des Frosches einzeln mit ihren Hüllen für 1 bis 12 Stunden; dann in 70 und 80 proz. Alkohol. Nun Abpräpieren der Hüllen (vergl. Lee und Mayer p. 305).
29. Mischungen nach Remak und Fol: 1. Kupfersulfat 6, Aq. dest. 100, 20—30 proz. Alkohol 100, Holzessig einige Tropfen. 2. 2 proz. Kupfersulfat 50, 25 proz. Alkohol 50, gereinigter Holzessig 35 Tropfen. Nach meinen Untersuchungen ergeben beide Gemische bei Frosch und Kröte recht gute Fixationsresultate; die nachträgliche Färbung ist aber fast unmöglich.

Färbungsmethoden.

2. Färbung

a) Färbung in toto

I. Färbung in toto:

1. Boraxkarmin in alkoholischer Lösung nach Grenacher. In der Farbe 24 Stunden, dann ebenso lange oder noch länger in HCl-Alkohol (auf 100 ccm 70 proz. Alkohol 5 Tropfen reine Salzsäure). Nachfärbung der Schnitte mit Bleu de Lyon in wässeriger Lösung (eine konz. wässerige Lösung wird mit Wasser verdünnt) oder mit Orange G in konz. wässeriger Lösung, von der ein Quantum

einem Entwässerungsalkohol zugesetzt wird. Man kann auch nach Born Orange G gleich dem saueren Differenzierungsalkohol zufügen. Ferner mit Pikrinsäure in wässeriger oder alkoholischer Lösung.

2. Hämatoxylin nach Delafield (Anfertigung der Farbe nach Carnoy und Lebrun: 2—3 Tropfen der Stammlösung kommen auf 50 ccm Wasser; dazu 2—3 Tropfen Indigkarmin). In dieser Farbe 24 Stunden; dann entweder Differenzieren mit HCl-Alkohol (und Neutralisieren mit Ammoniak-Alkohol) oder mit Jodwasser.[1])

b) Schnittfärbung

II. Schnittfärbung.

1. Boraxkarmin mit und ohne Nachfärbung.
2. Hämatoxylin (Boehmer) nach Born. Für die Anfangs- und Endstadien der Ovarialeier, für die Eileitereier und für gefurchte Eier: In der Farbe 5—15 Minuten, fliessendes Wasser einige Minuten, Abspülen in a) 70proz. Alkohol 200, Salzsäure 5 Tropfen, Orange G, konz. wässerig, 3 ccm oder b) $^1/_2$proz. Lösung von Eisenammonalaun mit Orange G bis zur Dunkelgelbfärbung versetzt. Für die Mittelstadien der Eireifung: Farbe 24 Stunden event. auf dem Paraffinofen; fliessendes Wasser einige Minuten, dann wieder in a) oder b). Nach der Differenzierung in a) Abspülen und Neutralisieren der Säure in 70° Alkohol, der eine Schicht Schlemmkreide am Boden enthält, nach derjenigen in b) langes Auswaschen in fliessendem Wasser.
3. Doppelfärbung von Hämatoxylin und Kongorot (Kongorot: $^1/_2$proz. wässerige Lösung).
4. Ehrlich-Biondi nach Drüner.

---

[1]) Perényi (Zool. Anzeig. V 1882) fixiert und färbt zugleich, indem er seiner Fixierungsflüssigkeit Eosin, Anilinviolett, Purpurin, Fuchsin, Anilinrot, Ammonpicrokarmin oder Boraxkarmin zusetzt. Die ersten drei Farben müssen vorher in drei Teilen Alkohol gelöst werden; die letzteren werden der Perényischen Lösung direkt hinzugefügt. Bildet sich ein Niederschlag so wird filtriert. Die Objekte bleiben in dem gefärbten Fixierungsgemisch 4—5 Stunden; sie kommen darauf in 50proz. Alkohol für 5 Stunden, dann in 70proz. Alkohol für 10 Stunden etc. Die Hüllen müssen gut entfernt sein.

5. Boraxkarmin-Bleu de Lyon: Im Boraxkarmin 5 Minuten; im HCl-Alkohol 15 Minuten; in konz. wässeriger Lösung von Bleu de Lyon 10 auf Aq. dest. 30 : 2 Minuten unter Schütteln, dann 85 proz. Alkohol etc.
6. Methylenblau (Nissl)-Van Gieson: Durch Xylol und die Alkoholreihe in Methylenblau $^{1}/_{2}$—1 Minute, in Aq. dest. kurze Zeit, in Säurefuchsin-Pikrinsäure kurze Zeit, dann wie gewöhnlich weiter.

3. Untersuchung lebender Eier

Zur Untersuchung eines und desselben lebenden Eies auf verschiedenen Stufen seiner Entwicklung bedient man sich entweder des neuen grossen Apparates von Zeiss, der es gestattet, ein und dasselbe Ei von oben und unten zu verschiedenen Zeiten zu photographieren (siehe Seite 69/70) oder des Verfahrens von Braus und von Kopsch. Braus entwarf von der Unterseite eines in Wasser an einem Blatt klebenden Tritoneies ein Bild in einem Kehlkopfspiegel und betrachtete dieses mit der Lupe. Kopsch kehrte das Mikroskop um und photographierte ein und dasselbe Ei von der Unterseite und zugleich in einem zweiten Apparate von oben. Ein auf die das Ei enthaltende Schale geklebter Papierstreifen diente als Richtungslinie, um Drehungen des Eies messen zu können. Ziegler empfiehlt, um den Schluss des Blastoporus zu sehen, „den Tubus des Mikroskops zur horizontalen Stellung umzulegen, den Schlitten, der die Blendung trägt, zu entfernen und den Laich in ein dünnwandiges etwa 2,5 cm weites Rohr gefüllt unmittelbar hinter das Loch des Objekttisches zu bringen".

4. Untersuchung im frischen Zustand

Zur Untersuchung der Froscheier in frischem Zustand gebraucht O. Hertwig Jodserum oder physiologische Kochsalzlösung; um den Kern frisch zu studieren, zerdrückt man nach Carnoy und Lebrun die Eier und isoliert den Kern. Man kann danach mit den Dämpfen der Osmiumsäure oder des schwefelige Säure enthaltenden Alkohols fixieren und mit Methylgrün, das mit Essigsäure angesäuert ist, färben.

5. Trockenpräparate

Zur Anfertigung von Trockenpräparaten verfährt man in folgender Weise: Die Eier (Kröte) sind in Chrom-Sublimat fixiert und liegen in 95 proz. Alkohol. Aus diesem kommen sie auf 24 Stunden in 95 proz. Alkohol und für 2×24 Stunden in absoluten Alkohol. Nun in eine Mischung von chemisch reinem Terpentin und absoluten

Alkohol aa $^1/_2$ Tag, in reines Terpentin die Nacht über. Dann giesst man das Terpentin ab und lässt das dem Ei noch anhaftende Terpentin langsam verdunsten. Man hebt die Eier trocken auf. v. Erlanger bringt die gehärteten Eier in absoluten Alkohol und lässt sie hierin langsam trocknen. Sind grosse Höhlen in den Eiern, so füllt er sie durch Durchtränkung mit Paraffin, entfernt dasselbe aber von der Oberfläche durch Terpentin oder Chloroform.[1])

6. Demonstrationspräparate nach Barfurth

Barfurth bringt zur Herstellung von Demonstrationspräparaten die Eier (Axolotl) mit den Hüllen in Alkohol 125, Glyzerin 25, Wasser 350. Die in gleicher Weise behandelten Eier von Rana schrumpfen aber nach meinen Beobachtungen nach sehr kurzer Zeit ganz beträchtlich.

Ältere Entwicklungsstadien Fixation

Fixation **älterer Entwicklungsstadien.** Van der Stricht fixiert Froschlarven in 1proz. Platinchlorid 16, 2proz. Osmiumsäure 4 auf 6 Tage. Dann fliessendes Wasser 1 Stunde; Alkohol.

Konz. Sublimatlösung auf 40—45° erwärmt gebrauchen Naue und Schoebel für Larven von Rana, Hyla arb., Siredon. Ohne Erwärmen arbeitet Mollier; er tötet die Larven von Triton alp. durch Einlegen in die Sublimatlösung für 10—20 Minuten. Dann Alkohol.

Ferner $^1/_4$—$^1/_3$proz. Platinchloridlösung in der Wärme (Rabl für Salamandra und Triton). Weiter $^1/_4$proz. Chromsäure und Flemming'sche Mischung. Eisen empfiehlt für Salamandra: 1. $^1/_2$proz. Platinchlorid 50, $^1/_2$proc. Iridiumchlorid 50, Eisessig 1, 2. $^1/_2$ oder $^1/_5$proz. Iridiumchlorid 100, Eisessig 1. Bouin verwendet für Rana folgendes Gemisch: Formol 1, konz. wässeriges Sublimat 3 für 2—3 Stunden. Dann kurzes Auswaschen. 70proz. Alkohol.

Zur Erhaltung von Form und Farbe der Larven von Rana empfiehlt Barfurth das Formol in 3—4proz. Lösung.

Vom Rath empfiehlt für die Larven von Salamandra sein Gemisch von Pikrin-Sublimat-Osmium-Essigsäure; Corning für Anuren das Pikrin-Sublimat von Rabl.

---

[1]) Perényi (Zool. Anzeig. V 1882) nimmt die mit seiner Flüssigkeit fixierten Eier aus dem abs. Alkohol und lässt sie frei liegen bis der Alkohol verdunstet ist. Dann benetzt er sie mit einigen Tropfen Nelkenöl oder Terpentin.

Literatur zu Kapitel 9

Born, Arch. Entwicklungsmech. Bd. 4; Arch. mikr. Anat. Bd. 43, 1894; Anat. Anz. Bd. 8. — Thon. Verh. d. V. intern. zool. Kongresses, Berlin 1901. — Häcker, Praxis u. Theorie d. Zellen- u. Befruchtungslehre, Jena 1899. — Wiedersheim, Arch. mikr. Anat. Bd. 36, 1890. — Carnoy-Lebrun, La cellule T. 17, 1900; La cellule T. 12, 1897. — Roux, Anat. Anz. Bd. 9, No. 8/9. — O. Hertwig, Entwicklung d. mittl. Keimbl. d. Wirbeltiere, Jena 1883; Arch. mikr. Anat. Bd. 39; Morph. Jahrb. Bd. 10. — Michaelis, Arch. mikr. Anat. Bd. 48. — Semper, Zool. Anzeig. Bd. 1. — O. Schultze, Arch. Entwicklungsmech. Bd. 1; Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 45, 1887; Arch. mikr. Anat. Bd. 55, 1900. — Whitmann, Amer. Natur. vol. 22, 1888; Methods. — Blochmann, Zool. Anz. Jahrg. 12, 1889. — Lee u. Mayer, „Grundzüge", 1901. — Meves, Arch. mikr. Anat. 50/48; Anat. Anz. Bd. 6, 1891. — Broman, Anat. Anz. Bd. 17. — Neumann, Virchows Archiv Bd. 159; Arch. mikr. Anat. Bd. 11. — Fick, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 56, 1893. — Rawitz, Arch. mikr. Anat. Bd. 47. — Flemming, Arch. mikr. Anat. Bd. 29. — Vom Rath, Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 57, 1894; Anat. Anz. Bd. 11, 1895. — Mc Gregor, Journ. of Morph. vol. 15, Suppl., 1899. — Drüner, Jen. Zeitschr. Naturwiss. Bd. 38. — Rossi, Arch. Entwicklungsmech. Bd. 5. — Levi, Arch. mikr. Anat. Bd. 55, 1899. — Lubosch, Habilitationsschrift, 1902, Jena. — Adler, Intern. Monatsschr. Anat. Physiol. Bd. 18. — Barfurth, Anat. Hefte Bd. 3, 1893; Arch. Entwicklungsmech. Bd. 9. — Grönroos, Anat. Hefte VI. 1896. — Braus, Jen. Zeitschr. Naturwiss. Bd. 29, 1895. — Spemann, Arch. Entwicklungsmech. Bd. 12. — Scott u. Osborn, Anat. Journ. Mikr. Sc. vol. 19, 1879. — Remak, zit. nach Lee u. Mayer „Grundzüge" p. 306. — Fol, zit. nach Lee u. Mayer „Grundzüge" p. 306. — Kopsch, Intern. Monatsschr. Anat. Physiol. Bd. 17, 1900. — H. E. Ziegler, Lehrb. d. vergl. Entwicklungsgesch. d. niederen Wirbeltiere, Jena 1902. — Erlanger, Zool. Jahrb. Abtlg. Anat. Ontog. Bd. 4, 1890. — van der Stricht, Arch. Biol. T. 12. 1892. — Naue. Jen. Zeitschr. Naturwiss. Bd. 63. — Schoebel, Zool. Jahrb. Abtlg. Anat. Ontogenie Bd. 4, 1890. — Mollier, Arch. Anat. Physiol., Anat. Abtlg., 1890. — Eisen, Zeitschr. wiss. Mikroskop. Bd. 14. — Corning, Morphol. Jahrb. Bd. 27, 1899. — Böhm u. Oppel. Taschenbuch, IV. Auflage.

Kapitel 10

Reptilien Vögel

Fortpflanzung

Fortpflanzung. Paarungszeiten (nach Boehm und Oppel): Lacerta: April bis Mai und Juni. Anguis fragilis: Mai. Pelias berus: Anfang April bis Mai. Tropidonotus natrix: Mai.

Über den Gecko (auf der Insel Menorka) macht Will folgende Angaben: Die Paarung ist von der Witterung abhängig; die Entwicklung umfasst einen Zeitraum von 8—10 Wochen, von welchen 4 Wochen im Eileiter durchlaufen werden. Die Ablage findet in zwei Perioden des Jahres statt, die durch ungefähr 4 Wochen von einander getrennt sind und zwar werden jedesmal je zwei Eier erzeugt. Zur Zeit der Ablage treten bei den Embryonen die Extremitätenanlagen auf.

Über die Fortpflanzung der Schildkröten gibt die Arbeit von Rabinowitsch folgende Aufschlüsse: Die Schildkröten befinden sich zwei Monate hintereinander in Kopulation; die Eiablage dauert nur 3—4 Stunden; sie erfolgt Mitte Juni (Bessarabien). Das Weibchen vergräbt die Eier im Sande. Um diese Brutstätten aufzufinden, folgt man am besten der Fährte des Fuchses, der den Eiern stark nachstellt. Hat man eine Brutstätte ermittelt, so kann man die Eier ausgraben und an einem geschützten Ort (Garten) wieder vergraben. Doch hat man bei dieser Methode infolge der Erschütterungen der Eier mit Misserfolgen zu rechnen. Besser ist es, die Stätte sich kenntlich zu machen, und ab und zu von ihr selbst einige Eier zu nehmen, ohne aber die danebenliegenden zu berühren.

Um sich eine Serie von Entwicklungsstadien der Reptilien zu verschaffen, legt man die zu verschiedenen Zeiten abgelegten Eier der Ringelnatter in ein folgendermafsen hergestelltes Terrarium: In einem weiten Glaszylinder bedeckt man den Boden mit einer

Schicht von Sägespänen; auf dieselbe kommt eine Lage von frischem Pferdemist, auf diesen die zuerst abgelegten Eier. Dann streut man auf letztere eine Schicht Sägespäne, die wieder von einer Lage Pferdemist bedeckt wird, auf den man dann die jüngeren Eier legt u. s. f. Man erhält so verschiedene Etagen von Eiern, die sich alle gut entwickeln und von denen die untersten die ältesten sind.

Weibl. Geschlechtsorgane

Weibliche Geschlechtsorgane. Die Eierstöcke der Eidechse, Blindschleiche, Natter werden nach Loyez am besten fixiert mit Flemming'scher, Zenker'scher oder Gilson'scher Flüssigkeit. Zur Färbung empfiehlt er, abgesehen von den gewöhnlichen Färbungsmethoden, eine Kombination von Magentarot mit Indigkarmin und Pikrinsäure. Auerbach fixiert mit Sublimat 4, Alkohol 20, Wasser 76.

Männl. Geschlechtsorgane

Isolation und Fixation

Männliche Geschlechtsorgane. Prenant isoliert die Samenelemente von Gecko, Anguis, Lacerta durch einen 3tägigen Aufenthalt in 1proz. Osmiumsäure. Zur Fixierung der Hoden sind bei den Reptilien fast alle üblichen Fixierungsmittel brauchbar.

Jüngere Entwicklungsstadien

1. Entfernung der Schale

Untersuchung **jüngerer Entwicklungsstadien.** Man befreit die Eier von dem Eileiter und bringt sie mit der Schale in die Fixierungsflüssigkeit. Die Schälung der Eier wird im Alkohol vorgenommen und muss möglichst bald nach der Fixation erfolgen. Boehm und Oppel empfehlen ausserdem bei jüngeren und älteren Stadien das Entfernen der Schale vor der Fixation. Sie wird in physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen. Man erhebt mit einer spitzen Pinzette die Schale zu einer Falte, schneidet diese durch und schält dann in der Richtung der ersten Falte weiter. Beim Töten der Tiere warnt Ballowitz davor, die Tiere zu dekapitieren, weil die damit verbundenen Reflexbewegungen die Eier und Embryonen schädigen. Er empfiehlt Chloroform.

2. Töten der Tiere

3. Fixation

Geeignete Fixierungsmittel sind:

1. Ein Gemisch von Chromsäure, Sublimat, Eisessig, Formalin und Wasser. Es besteht aus:

1proz. Chromsäure	30
Sublimat, in Kochsalzlösung ges.	30
Aq. dest.	27
Eisessig	3
Formalin	10

Eidechse
Ringelnatter
Kreuzotter
Blindschleiche
Schildkröten
Podocnemis
Krokodil

Es hat sich nach den im anat.-biol. Institut angestellten Versuchen für die Eier der Ringelnatter, Kreuzotter, Blindschleiche und Eidechse sehr gut bewährt. Vergl. darüber Gerhardt. Die Schälung hat erst im Alkohol einzutreten. Die Eier bleiben 24 Stunden in dem Gemisch und werden dann, bevor sie in den Alkohol kommen, 24 Stunden in fliessendem Wasser gewaschen.

2. Zenker'sche Flüssigkeit nach Ballowitz für Ringelnatter. Die Eier kommen mit der Eileiterhaut auf 1—2 Stunden in diese Flüssigkeit. Dann entfernt man die Haut des Eileiters und fixiert die Eier mit ihrer Schale noch weitere 12—24 Stunden in der Zenker'schen Flüssigkeit. Dann Schälen und weitere Fixation für 1—2 Stunden. Dann Alkohol.
3. Formol-Pikrinsäure-Essigsäure nach Bouin (Blindschleiche).
4. Oppel verwendet für Blindschleiche und Natter zwei Fixierungsflüssigkeiten: a) konz. wässeriges Sublimat 9, Eisessig 1; b) konz. wässeriges Sublimat 9, Flemming'sche Lösung 1. Er hebt dabei hervor, dass die Eier der Blindschleiche sofort nach dem Einlegen in das Fixationsmittel, diejenigen der Natter nach 3stündigem Verweilen in demselben geschält werden müssen. Das Material bleibt in a) 2 Stunden, in b) $^1/_4$ Stunde, wird aber dann noch auf 2 Stunden in die Sublimatlösung gebracht.
5. Sublimat-Chromsäure (Lo Bianco): konz. Sublimat 2, 1proz. Chromsäure 1. Oppel für Ringelnatter. Fixationsdauer 3 Stunden; dann Schälen. Alkohol.
6. $^1/_2$proz. Chromsäure. Ballowitz für Ringelnatter, Schlingnatter, Kreuzotter. Ferner nach demselben Autor
7. 4proz. Formollösung.
8. $^1/_2$proz. Chromsäure 1, 3proz. Salpetersäure 3.
9. Ein Gemisch von 0,5proz. Chromsäure und 0,1proz. Essigsäure. Vay für Ringelnatter.

10. Chrom-Osmium-Essigsäure. Will für Gecko. Der Osmiumsäuregehalt darf nur so hoch genommen werden, dass der Dotter gerade leicht gebräunt wird. So tritt der Unterschied zwischen ihm und der Keimscheibe gut hervor.
11. Osmiumsäure (1 : 1000). Kupffer öffnet die Eier in der Osmiumsäure. Dann Entfernung des Eiweisses. Der Dotter kommt auf 24 Stunden in Chromsäure (1 : 300). Das Blastoderm wird umschnitten, in Wasser gewaschen und für 3 Stunden in Glyzerin-Alkohol-Wasser aa, dann in 90proz. Alkohol gebracht.
12. Pikrin-Schwefelsäure. Mitsukuri für Schildkröten: Entfernung der Schale und des Eiweisses. Bezeichnen der Lage der Keimscheibe mit einem Haar. Die Eier kommen mit dem Blastoderm nach oben in die Pikrinschwefelsäure. Umschneiden der Keimscheibe; dann Weiterfixation derselben. Nach Boehm und Oppel übertrage man die Reptilieneier, ohne sie zu schälen, in Pikrin-Schwefelsäure auf 5—6 Stunden, dann in Aq. dest.; hier erfolgt das Schälen. Dann Alkohol.
13. Pikrin-Essigsäure. Boehm und Oppel. Ebenso angewandt wie die Pikrin-Schwefelsäure. Die Flüssigkeit ist, wie folgt, zusammengesetzt: Pikrinsäure, konz. wässerig, wird mit 2 Teilen Wasser verdünnt. Zu dem ganzen Volumen wird 1 % Eisessig gemischt, Fixationsdauer 24 Stunden.
14. Mehnerts Fixationsmethoden zur Untersuchung jüngerer Stadien von Emys lut. Die Eier, welche dem Eileiter entnommen sind, oder wenige Tage nach der Ablage zur Untersuchung gelangen, werden nach vorsichtiger Eröffnung der Kalkschale in 0,5proz. Chromsäurelösung gebracht. In derselben werden die Eiweisshüllen von Dotter und Dotterhaut mit Pinzetten und Pinsel entfernt. So wird die Eidotterkugel in toto fixiert; nach 1—2 Tagen umschneidet man den Keim und bringt ihn ohne Auswaschen in 30, 50, 80 und 96proz. Alkohol auf je 24 Stunden. Um den Keim in jungen Stadien gut auf der Dotterkugel sichtbar zu machen, kann man dieselbe in physiologischer

Kochsalzlösung von dem Eiweiss befreien und nun solange $^{1}/_{4}$ proz. Osmiumsäure aufträufeln, bis der Keim durch Schwärzung deutlich wird. Nun wird er umschnitten und in Alkohol gebracht.

Bei älteren Eiern tritt eine innige Verklebung der vorderen Amnionfalte mit der Innenmembran der Kalkschale ein; solche Eier muss man in der Weise behandeln, dass man die Schale an einem dem Embryo gegenüberliegenden Punkte öffnet und so auf 24 Stunden in 0,5 proz. Chromsäure legt. Danach vergrössert man die Öffnung und kann nun leicht Amnionfalte und Kalkschale von einander trennen. Man härtet dann noch weiter 24 Stunden. Hat der Gefässhof die Hälfte der Dotterkugel überzogen, so kann man die Dotterkugel anstechen und den Inhalt ausfliessen lassen; man erreicht dadurch, dass Gefässhof und Dotter der Schale angelagert bleibt.

Ältere Embryonen, bei denen Verknöcherung im Gange war, wurden von Mehnert mit konz. wässriger Pikrinsäure fixiert.

15. Ähnlich ist das Verfahren von Voelzkow für die Eier von Podocnemis und vom Krokodil. Hierbei wird die Schale vor der Fixation zum Teil entfernt und das Eiweiss mit einer gebogenen Nadel und Schere beseitigt, was ganz besonders vorsichtig beim Krokodilei geschehen muss, um auch die geringste Verletzung des Dotters zu vermeiden. Dann kommt das Ei in 0,5 proz. Chromsäure, in der man die gerinnenden Eiweissteilchen mit der Pinzette entfernt. Nach 1—2 Stunden umschneidet man den Keim und fixiert ihn isoliert noch einen Tag in der Chromsäure. Dann Wasser, Alkohol.

Ältere Entwicklungsstadien

Untersuchung **älterer Entwicklungsstadien.** Vergl. auch die oben unter 14 und 15 erwähnten Methoden. Weiter

1. Kleinenberg's Flüssigkeit für Blindschleiche und Eidechse. Mitsukuri für Schildkröten: Man öffnet vorsichtig in der Pikrin-Schwefelsäure die Schale und präpariert sie nach einiger Zeit behutsam von den im Fixierungsmittel erhärtenden Eihüllen ab.

2. Sublimat-Eisessig (Eisessiggehalt 5 %). Die Eier (Blindschleiche, Eidechse) kommen mit den Schalen in dieses Fixierungsmittel für 2—3 Stunden; dann in konz. wässerige Pikrinsäure für 8, 12, 24 Stunden. Darauf Schälen in Wasser und Alkohol.
3. Sublimat-Chromsäure nach Lo Bianco; siehe oben unter 5.
4. Flemming'sche Flüssigkeit.
5. das oben erwähnte Gemisch von Chromsäure, Sublimat, Eisessig, Formalin und Wasser, das auch für ältere Stadien sehr zu empfehlen ist.
6. Pikrin-Essig-Sublimat.
7. Ballowitz bringt die Eier ungeschält in Essig-Sublimat (5 % Eisessig), in Rabl's Pikrin-Sublimat oder in Zenker'sche Lösung für 12 Stunden; entfernt dann die Eischale und lässt die Fixierungsflüssigkeit noch 1—2 Stunden einwirken. Dann gleich in Alkohol. Vergl. auch die Methoden desselben Forschers für jüngere Stadien oben unter 6—8.

Vögel

Fortpflanzung

Fortpflanzung. Bei der Henne genügt nach Harvey eine einmalige Befruchtung für 20, nach Coste für 5—6 Eier. Die Furchungsstadien verlaufen im Eileiter; wenn das Ei gelegt wird, hat es meist schon die beiden ersten Keimblätter. Doch kann sein Entwicklungszustand auch ein ganz variabler sein. Nach His hängt das damit zusammen, dass die Eier in verschiedenen Jahreszeiten die Eileiter schneller oder langsamer durchlaufen, schneller im Frühjahr und Sommer, langsamer im Herbst. Nach seinen Beobachtungen sind denn auch die Eier im Herbst durchschnittlich weiter entwickelt. Einen Einfluss hat aber auch die Zeit, die zwischen dem Legen und dem Anfange der Untersuchung verstrichen ist. Ist sie sehr gross und die Tagestemperatur kalt, so kann das Ei natürlich leicht absterben, hält sie sich aber in mäfsigen Grenzen und ist die Temperatur des Aufbewahrungsraumes warm, wie im Sommer, so geht die Entwickelung ungehindert, wenn auch langsam, weiter. Carl Ernst v. Baer sagt: „Bei einer Wärme, die einige Grade geringer als 28° R. ist, stirbt der Embryo noch weniger ab, sondern er entwickelt sich nur

langsamer; dann folgt ein noch tieferer Grad der Temperatur, welcher ohne Weiterbildung das Leben doch erhält. An einem Ei, welches ich im Juli öffnete, nachdem es 30 Stunden lang in der Stube gelegen hatte, bemerkte ich, dass das Herz ohne Anwendung künstlicher Wärme eine Pulsation machte. Ich wartete nun auf einen zweiten Herzschlag und dieser erfolgte wirklich nach einer sehr langen Pause. Hierdurch aufmerksam gemacht, stellte ich Versuche an und fand, dass in allen Eiern, die ich im Juli (bei ansehnlicher Hitze im Freien) in einer nach Norden liegenden Stube, in welcher überdies zur Abkühlung die Fenster während der Nacht immer offen standen, aufbewahrte, der Embryo nach Verlauf von vierundzwanzig Stunden *nie* abgestorben war, sondern der Herzschlag in sehr langen Zwischenräumen, zuweilen weniger als einer Minute, in anderen Fällen von 5 und mehr Minuten fortbestand." Einen grossen Einfluss übt auf die Weiterentwicklungsfähigkeit befruchteter Eier der Transport aus, den sie bis zur Brütmaschine durchgemacht haben. Die mit ihm verbundenen unvermeidlichen Stösse und Erschütterungen schädigen das Ei. Man muss daher Bruteier, besonders wenn sie von weit herkommen, zur Ruhe kommen lassen, ehe man sie in die Brütmaschine bringt. Sie bleiben daher zweckmäſsig erst 24^{h} in einem kühlen Raume horizontal liegen.

Brütmaschine

Die Temperatur der Brütmaschine soll 38—39° betragen, 39° C. aber nicht übersteigen; eine Erhöhung derselben über 39° C. wirkt unbedingt schädlich, nicht so eine Erniedrigung. Ein kurzes Fallen der Temperatur um mehrere Grade hat keinen schädlichen Einfluss: auch die Henne verlässt ja zeitweise Nest und Eier. Sehr starke und anhaltende Schwankungen der Temperatur dagegen bewirken leicht Missbildungen. Die Brütmaschine muss geräumig sein; sie muss entweder einen beständigen Luftwechsel gestatten, oder mehrere Male am Tage geöffnet werden. Ausserdem muss die Luft in derselben feucht sein, was durch Hineinstellen einer Schale mit Wasser erreicht wird. Sehr zweckmäſsig ist der Vorschlag von Éternod die Brütmaschine so einzurichten, dass die Wärme die Eier nicht von unten, sondern von oben trifft. Auch die Henne sitzt ja auf den Eiern. Das ist zum Teil erreicht bei dem Leipziger Brütapparat, bei dem in Kautschukschlingen warmes Wasser von einer bestimmten Temperatur (36°—39° C.) über die Eier geleitet wird. Die Lage der Eier im Brütofen ist nicht gleichgültig; sie müssen horizontal

liegen. Bei vertikaler Stellung gehen die Embryonen ausnahmslos zu Grunde, eine Beobachtung, die schon v. Baer gemacht und die dann von neuem von Gerlach bestätigt wurde.

Brütezeiten

Brütezeiten:

Huhn	21 Tage
Ente	21 „
Gans	29 „
Taube	17—19 „

»Unbefruchtete Eier entwickeln sich nicht«

Die Eier müssen befruchtet sein, wenn sie sich entwickeln sollen. Unbefruchtete Eier entwickeln sich nicht weiter. Oellacher hatteangegeben, dass sich auch unbefruchtete Eier bis zu einem gewissen Stadium entwickeln und Duval war ihm gefolgt. Das ist aber nach den Angaben von Kionka, Kölliker und Nowack falsch. Auch Barfurth ist dieser Frage näher getreten: Er gibt auf Grund seiner experimentellen Untersuchung an, dass „vom Hahn isolierte Hennen noch bis zum Beginn der vierten Woche befruchtete und entwickelungsfähige Eier legen. Von der dritten Woche an bis zum Ende der fünften Woche kann eine mangelhafte Befruchtung durch überreife Spermatozoen vorkommen; solche Eier verhalten sich ähnlich wie unbefruchtete. Nach dem vierzigsten Tage der Isolierung vom Hahn gelegte Eier sind sicher unbefruchtet“. Die Umlagerung des Eies mit der Schalenhaut findet nach Kölliker im unteren Drittel des Eileiters statt, dort wo auch die Furchung beginnt. Ein solches Ei zeigt dann schon einen stumpfen und einen spitzen Pol.

Bildung der Schalenhaut

Lage der Keimscheibe im Ei

Durch die Unterschiede in den beiden Polen ist man in den Stand gesetzt, vorn und hinten an Keimscheiben zu unterscheiden, die noch keinen Primitivstreifen zeigen. Man muss dazu nach C. E. v. Baer, Duval, Kupffer, Koller, Gerlach und Nowack so verfahren, dass man das Ei horizontal so vor sich hinlegt, dass der stumpfe Pol nach links, der spitze nach rechts sieht. Verbindet man die Mitte der beiden Pole durch eine Linie, so schneidet dieselbe die Keimscheibe und teilt sie in zwei Hälften. Die dem Untersuchenden zunächst liegende ist das zukünftige hintere, die andere das zukünftige vordere Ende des Embryo. Bei 166 Eiern, die Duval am dritten Bebrütungstage öffnete, stimmte diese Regel 124 mal; 26 mal war das Kopfende nach links (nach dem stumpfen Pol zu) 13 mal nach rechts (nach dem spitzen Pol zu) abgewichen.

Zweimal lag der Embryo parallel der Verbindungslinie beider Pole mit dem Kopfende nach links, einmal endlich war die Regel in ihr Gegenteil verkehrt, der Embryo wurde zwar durch die Pollinie halbiert. doch lag das Kopfende dem Beschauer zunächst. Nach Féré haben die Fälle, wo bei normal bebrütetem Ei die Abweichung der Lage von dieser Regel 45° überschreitet, einen Prozentsatz von 10 : 100.

Junge Entwicklungsstadien

Fixation

Untersuchung **jüngerer Entwicklungsstadien.** Man kann die hierbei angewandten Fixationsverfahren in zwei Gruppen scheiden.

1. in solche, bei denen die Keimscheibe zusammen mit dem Dotter fixiert wird,
2. in solche, wo die Keimscheibe vom Dotter abpräpariert und für sich allein fixiert wird.

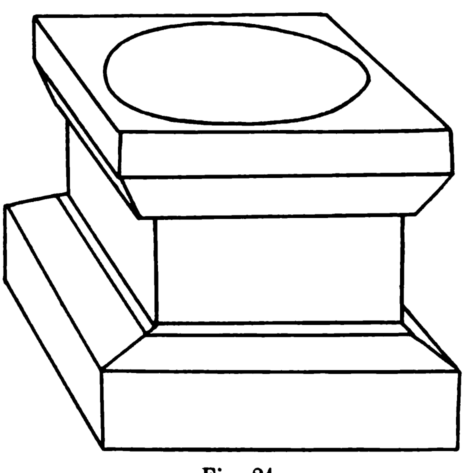
Das erste Verfahren ist anzuwenden für die Furchungsstadien und für die ersten Veränderungen am gelegten Ei infolge der Bebrütung. Ich beschreibe hier

1. die Methode von Nowack,
2. die Methode von Mitrophanow;

aus historischem Interesse erwähne ich dann noch

3. die Methode von Duval,
4. die Methode von Kionka.


1. nach Nowack


Fig. 24.

Die Methode von Nowack besteht darin. dass man das Ei horizontal mit dem stumpfen Pole nach links, dem spitzen nach rechts vor sich hinlegt. Dazu ist sehr bequem der in Fig. 24 abgebildete, aus Holz hergestellte Eierhalter, wie er im anat.-biolog. Institut gebraucht wird.

Nun macht man vorsichtig durch Schlagen mit einer stumpfen anatomischen Pinzette in die Kalkschale des Eies zwischen spitzem und stumpfem Pole eine Oeffnung, die man dann durch successives

Abbröckeln von Kalkstücken mit der Pinzette so lange erweitert, bis der Keim sichtbar wird. In der Nähe desselben wird am spitzen Pol innerhalb der Verbindungslinie der beiden Pole ein Igelstachel eingesteckt. Koller stach in den Dotter ein spitz-dreieckig zugeschnittenes Papier, so dass es dicht am hintersten Ende der Keimscheibe lag und die zukünftige Medianebene markierte. Jetzt bringt man das ganze Ei in eine grosse Schale mit erwärmter physiolog. Kochsalzlösung und entfernt die Kalkschale vollständig. Dann wird das Eiweiss an der einen Seite des Dotters mit einer grossen Schere durchschnitten und der Dotter durch Schwenken des Eies mit Hilfe zweier stumpfer anatomischer Pinzetten, die den übrig bleibenden Eiweissmantel fassen, durch den Schlitz des Eiweisses hinausgetrieben. Der Dotter muss vollkommen von Eiweiss befreit sein. Ist das der Fall, so kommt er in folgende Fixierungsflüssigkeit:

1/2 proz. Chromsäure	30 ccm
Subl. in physiol. Kochsalzlösung ges.. .	30 „
Eisessig.	3 „
Aq. dest.	37 „

für 3×24^h, während welcher die Flüssigkeit häufig erneuert wird. Man kann auch dem Fixierungsmittel Formalin zufügen, so dass dann eine Mischung resultiert, wie sie Gerhardt für Reptilien verwandt hat, nämlich

1 proz. Chromsäure	30 ccm
Subl. in physiol. Kochsalzlösung ges.. .	30 „
Eisessig.	3 „
Formalin	10 „
Aq. dest.	27 „

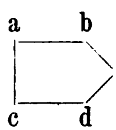
Die Zeitdauer der Fixation beträgt hierin 24^h; dann ersetzt man dieses Gemisch durch das erste, das man häufig innerhalb der nächsten 2 Tage wechselt.

Um dieses Wechseln der Flüssigkeiten, das spätere Auswaschen und Übertragen in die verschiedenen Alkohole für die Eier so schonend wie möglich zu machen, habe ich mir eine Anzahl Becher anfertigen lassen, die in Figur 25 (Seite 174) abgebildet sind und deren Anwendung sich leicht aus dieser Zeichnung ergibt:

Das Ei befindet sich im Becher (a). Aus der Flasche kann nun neue Fixierungsflüssigkeit oder später Alkohol verschiedenen

Prozentgehaltes in den Becher gelassen werden; die alte Flüssigkeit fliesst durch den Hahn (b) ab. Reguliert man Zufluss und Abfluss so, dass jeder tropfenweise erfolgt, so geschieht die Erneuerung der Fixierungsflüssigkeit resp. die Überführung von einem Alkohol in den nächst stärkeren in der denkbar schonendsten Weise [1]).

Wenn nun auch der ganze Dotter innerhalb der angegebenen Zeit durchaus nicht vollständig durchfixiert ist, so haben doch seine Partien in der Umgebung der Keimscheibe die nötige Festigkeit gewonnen, um später im Alkohol ein Abschneiden der Keimscheibe zu gestatten. Dieses geschieht im 70 proz. Alkohol und erfolgt in Form eines Fünfeckes



mit der Spitze nach dem spitzen Pol, d. h. nach dem Igelstachel, der ja den spitzen Pol markiert. Die abgeschnittenen Keimscheiben bringe ich in den auf Seite 55/56 beschriebenen Apparat. So ist die bestmöglichste Schonung der Keimscheiben bei allen folgenden Prozeduren, der Einwirkung der verschiedenen Alkohole, des Chloroforms, bei der Einbettung gewährleistet. Die Schnittrichtung basiert auf der durch die Form des Fünfeckes bekannten Orientierung der Kernscheibe; ab gibt die Querrichtung, ac die Längsrichtung an (unter Zugrundelegung der Baer-Duval'schen Regel).

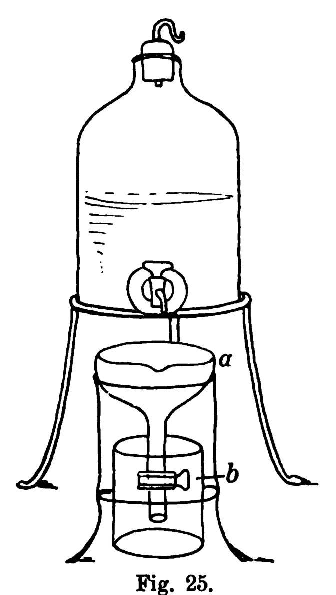


Fig. 25.

Ich empfehle Schnittfärbung mit Boraxkarmin; da die Chromsäure die Färbung erschwert, so bringe ich die Objektträger für 24 Stunden in Aq. dest.; erst dann durch die Alkoholreihe in Boraxkarmin für 24 Stunden; ebenso-

[1]) Die Becher sind hergestellt worden von Herm. Kobe, Berlin, N. W., Hannover'sche Str. 14.

lange in salzsäurehaltigen und in 70 proz. Alkohol. Den HCl-Alkohol wechsele ich einmal. Dann wie üblich weiter.

2. nach Mitrophanow

Die Methode von Mitrophanow besteht in der Anwendung grosser Mengen reiner 3 proz. Salpetersäure, und zwar kommt sie allein oder nach ihr noch das Pikrinsublimatgemisch oder das Chrom-Osmium-Essigsäuregemisch zur Verwendung. Das Öffnen des Eies geschieht wie bei Nowack, d. h. durch vorsichtiges Anschlagen in der Mitte zwischen stumpfem und spitzem Pol. Ist der Keim sichtbar, dann träufelt Mitrophanow 3 proz. reine Salpetersäure auf Eiweiss und Dotter. Die geronnenen Eiweisspartikelchen werden unter fortwährendem Aufträufeln des Fixierungsmittels durch vorsichtiges Abpinseln entfernt. Liegt der Keim frei von Eiweiss da, so fixiert man ihn in derselben Weise mit der Salpetersäure (immerwährendes Aufträufeln neuer Flüssigkeit) für eine halbe Stunde oder nur für 10—15 Minuten [siehe unter b)]. Hält man sich an die Baer-Duval'sche Regel, so wird die Keimscheibe in richtiger Weise (Fünfeck, Spitze nach dem Kopfende) umschnitten. Die Weiterbehandlung kann nun in doppelter Weise vor sich gehen:

a) die Keimscheibe ist umschnitten; das darauf mit einem breiten Spatel vom Dotter abgehobene Stück kommt für $^1/_4$ Stunde in die 3 proz. Salpetersäure, dann in 30 proz. Alkohol. Dieser wird erneuert, sobald er sich trübt. Hierin bleibt das Objekt 2—3 Stunden. Dadurch löst sich der Überschuss des Dotters, der an der Keimscheibe haftet;
b) nach der Salpetersäure wird während einer halben Stunde Pikrinsublimat oder Chrom-Osmium-Essigsäure auf die Keimscheibe geträufelt. Dann Umschneiden derselben und Abheben. Das Objekt kommt dann noch einige Zeit in das nach der Salpetersäure angewandte Fixierungsmittel.

Man kann auch noch ein anderes Verfahren nach Mitrophanow anwenden. Man öffnet das Ei, giesst das überschüssige Eiweiss ab und schüttet den Dotter mit dem etwa noch daran haftenden Eiweiss in eine grosse Menge 3 proz. Salpetersäure. Mit einer Pipette entfernt man von der Oberfläche der Keimscheibe, die nach oben gekehrt sein muss, das gerinnende Eiweiss. Die Salpetersäure muss dabei, sobald sie trüb wird, erneuert werden, durch Absaugen mit der Pipette und Aufträufeln neuer Lösung. Ist die Dottermembran über dem Keim freigelegt, so bleibt der Dotter in der

Flüssigkeit noch eine halbe bis eine Stunde. Dann Umschneiden und wie bei a) weiter. Oder man entfernt, wenn der Keim von Eiweiss freigelegt ist und HNO_3 eine Zeitlang eingewirkt hat, die Lösung durch Absaugen solange, bis der Keim und ein Teil des Dotters unbedeckt ist. Nun träufelt man während 10—15 Minuten auf die Keimscheibe Pikrinsublimat oder Chrom-Osmium-Essigsäure auf, umschneidet und verfährt weiter wie bei b).

Aufheben fixierter Keimscheiben nach Mitrophanow zum Zwecke späterer Bearbeitung

Aufheben der Keimscheiben nach Mitrophanow zum Zwecke späterer Bearbeitung.

1. Die Objekte kommen aus dem 30proz. Alkohol in 70proz., dann in eine Mischung von 70proz. Alkohol und Glyzerin zu gleichen Teilen. Hierin bleiben sie.

   Oder:

2. Die Objekte kommen aus dem Alkohol in $^1/_2$proz., dann in $1^1/_2$proz. Photoxylin und mit einer geringen Menge desselben in 70proz. Alkohol.

3. nach Kionka

Kionka hat die Stadien vom Beginn der Furchung bis zum Auftreten der primären Keimblätter untersucht. Die mit einer häutigen oder schon verkalkten Schale bedeckten Eier wurden in 0,6proz. Kochsalzlösung geöffnet, in der Verbindungslinie der Chalazen am stumpfen und spitzen Pol Igelstacheln eingesteckt, von denen der am stumpfen Pole einen roten Faden trug. Nun kamen die Dotter auf Watte in ein Gefäss mit heissem Wasser, das eine Temperatur von 90° hatte, für etwa 10 Minuten, dann auf 24—36 Stunden in 70proz. Alkohol. Hierin wurde die Keimscheibe umschnitten.

4. nach Duval

Die Duval'sche Methode ist interessant hauptsächlich wegen der Art und Weise, wie er die Orientierung der Keimscheibe vornahm. Er bog nämlich einen schmalen Pappstreifen in der Form eines gleichschenkeligen Dreieckes zusammen, befreite im horizontal liegenden Ei den Dotter durch Absaugen mit der Pipette vom Eiweiss und setzte den Papprahmen nun so auf den Dotter, dass er den Keim umgab. Den so gebildeten dreiseitigen Raum füllte er mit Osmiumsäure (1 : 300 bis 1 : 400); sein Boden, unter dem die Keimscheibe liegt, wird somit geschwärzt in Form eines Dreieckes. Setzt man nun das Pappdreieck mit Hilfe der Baer-Duval'schen Regel so auf, dass die Spitze nach dem künftigen hinteren Ende des Embryo, d. h. nach dem Untersuchenden gerichtet ist, so gibt

uns später das geschwärzte Dreieck die Anhaltspunkte für die Schnittrichtung. Alsdann kamen die Dotter in $^1/_3$ proz. Chromsäurelösung. Ein sehr gewichtiger Nachteil dieser Methode liegt darin, dass durch die einseitige Osmiumsäurewirkung von oben her, verbunden mit der nachfolgenden Härtung in Chromsäure, die Verbindungen des Keimes mit dem Dotter, auf die es gerade ankommt, zerrissen werden. Es fragt sich aber noch, ob die Duval'schen Bilder ausschliesslich seiner fehlerhaften Methode zuzuschreiben sind; einen grossen Teil der Schuld tragen auch die von ihm benutzten Eier. Selbst mit der sonst so ausgezeichneten Nowack'schen Methode erhielt ich mehrmals bei Enteneiern ganz ähnliche Bilder wie Duval.

Methoden, bei denen die Keimscheiben vom Dotter abgetrennt und für sich allein weiter fixiert werden.

Fixation vom Dotter abgetrennter Keimscheiben

Sie eignen sich hauptsächlich für Keimscheiben, die länger als 24 Stunden bebrütet sind. Ich verfahre dabei in der Weise, dass das Ei in der Mitte zwischen stumpfem und spitzem Pol geöffnet und das Eiweiss, nach Durchtrennung der Chalazen, abgegossen wird. Auf die Keimscheibe wird das Fixativ, hauptsächlich Pikrinsäure-Sublimat-Eisessig, geträufelt. Ist sie trüb geworden oder hat der Herzschlag des Embryo aufgehört, so schüttet man den Eiinhalt in ein Gefäss mit physiologischer Kochsalzlösung und umschneidet die Keimscheibe ausserhalb des Sinus terminalis schnell mit einer gebogenen Schere. Dann wird die abgeschnittene Keimscheibe mit einem Spatel in eine neue Schale mit physiologischer Kochsalzlösung gebracht. Hier entfernt man vorsichtig die Dotterhaut, die auf der Keimscheibe liegt, indem man die beiden Häute mit möglichst scharfen und spitzen Pinzetten von dem Teil aus, der den Sinus terminalis überragt, auseinander zieht. Meist gelingt das sehr leicht. Hat man sie erst an einer kleinen Stelle getrennt, so genügt es oft, dass man die Keim- oder Dotterhaut allein mit der Pinzette fasst und in der Flüssigkeit herumbewegt; dann löst sich die andere Haut durch die Strömungen von selbst. Nun kommt es darauf an, die Keimscheibe so zu fixieren, dass sie nicht zusammenrollt. Zu diesem Zwecke legt man sie glatt auf einen Hornspatel; nun träufelt man mehreremale das Fixierungsmittel hinauf und lässt sie, angefeuchtet mit dem Fixierungsmittel, auf dem Spatel etwa 1 Minute lang ruhig liegen. Dann taucht man den Spatel mit der Keim-

scheibe in das fixierende Gemisch; nach einiger Zeit hebt sie sich glatt vom Spatel ab und rollt nun nicht wieder zusammen.

Fixation älterer Embryonen (vorbereitende Präparation)

Ältere Eier, bei denen die Keimhaut den Dotter zum grössten Teil umwachsen hat und die grössere Embryonen beherbergen, öffne ich an dem einen Pole und suche mit einer Schere den Teil des Dotters zu erreichen, wo er noch nicht vom Gefässhof bedeckt ist. Hier steche ich ihn an und lasse den Dotter ausfliessen. Geht man dabei mit Vorsicht zu Werke, so kann man es leicht erreichen, dass der Embryo mit seiner Gefässhaut, während des Ausfliessens des Dotters, an der Innenfläche der Schale festklebt. Nun füllt man die Schale mit der Fixierungsflüssigkeit oder legt sie in diese hinein. Nach einiger Zeit kann man dann leicht Embryo und Gefässhaut von der Schale abheben und allein weiter fixieren.

Fixation nach His

His schlägt das Ei am stumpfen Pol auf, giesst das Eiweiss soweit wie möglich ab und schüttet den Dotter mit dem anhaftenden Eiweiss in eine Schale. Nun durchtrennt er die Chalazen und befreit den Dotter völlig vom Eiweiss. Jetzt wird der Keim umschnitten, auf ihn ein Deckglas gelegt, an welches er festklebt und mit dessen Hilfe er vom Dotter abgehoben wird. Durch Aufträufeln von Jodserum wird er von Dotter und Dotterhaut befreit. Vermöge des Deckglases kann man ihn bequem transportieren. Man kann ihn von oben und unten besichtigen, wenn man das Deckglas auf einen mit einer Öffnung versehenen Objektträger legt. Man fixiert ihn durch Beträufeln mit 0,5proz. Osmiumsäure. Eine andere Methode von His besteht darin, dass er nach Entfernung des Eiweisses den Dotter mit 10proz. wässeriger Salpetersäure übergiesst. Hierin verweilt derselbe mehrere Stunden. Dann umschneidet man die Keimscheibe, hebt sie mit einem breiten Spatel ab und bringt sie in $^{1}/_{2}$proz. Alaunlösung, in der man die Dotterhaut abzieht. Dann Durchfärben mit Hämatoxylin.

Versilberung der Keimscheiben

Versilberung der Keimscheiben. I. Vialleton: Die isolierte Keimscheibe kommt auf eine Glasplatte und es wird 1proz. Lösung von Arg. nitricum aufgeträufelt. Dann Wasser und 6—12 Stunden 70proz. Alkohol im Dunkeln. II. Boehm und Oppel: Fixation mit 3—5proz. Salpetersäure 100, 1proz. Arg. nitricum 5—10 ccm. Dann Alkohol.

Untersuchung älterer Entwicklungsstadien. Brauchbare Fixierungsmittel sind:

Ältere Entwicklungsstadien (Fixation)

1. Eisessig-Sublimat in Verbindung mit Chromsäure. Abraham für den Wellensittich: Die Embryonen kommen zuerst in Sublimat-Eisessig (Subl. konz. wässerig 95, Eisessig 5) auf 10 Minuten; danach in Chromessigsäure (Chromsäure 0,025 : 100, Eisessig 3—5 Tropfen).
2. Formol in 15proz. Lösung (Abraham für den Wellensittich).
3. Pikrinsäure-Sublimat-Eisessig. Hühner- und andere Embryonen von 48 Stunden an aufwärts.
4. Pikrin-Sublimat (Rabl). Embryonen von 3 bis 4 Tagen an (Rabl).
5. Platinchlorid-Sublimat (Rabl). Keimscheiben und junge Embryonen. „Sollte sich eine Schrumpfung bemerkbar machen, so setzt man mehr Wasser zu unter Erhöhung des Platinchloridgehaltes (z. B. 2proz. Platinchloridlösung)“ (Rabl).
6. Platinchlorid-Pikrinsäure (Rabl). Keimscheiben und junge Embryonen der Ente.
7. Zenker'sche Mischung. Sehr gut für Embryonen (Ente) vom 2. Tage an.
8. $^1/_3$proz. Platinchloridlösung. Nur für Oberflächenbilder, deren Details aber sehr gut hervortreten (Rabl).
9. Das oben[1]) erwähnte Chromsäure-Sublimat-Eisessig-Formalingemisch. Für Embryonen vom 3. Tage an. Nach einer Fixationsdauer von 24 Stunden ist entweder sofort auszuwaschen oder das Nowack'sche Gemisch[2]) für einen halben Tag anzuwenden und dann erst auszuwaschen.
10. Von den Osmiumgemischen die Hermann'sche und die Flemming'sche Flüssigkeit.

Einige besondere Methoden. Durchfärbung der Embryonen mit Hämacalcium (Suschkin). Die Embryonen sind mit Sub-

Einige besondere Methoden a) Durchfärbung mit Hämacalcium

[1]) Siehe Seite 173.
[2]) Siehe Seite 173.



limat fixiert; die Färbungszeit dauert bis 5 Tage lang; das Hämacalcium wird für kleine Embryonen mit Alkohol auf das Doppelte, für grössere auf das 4—5fache verdünnt.

b) Eisenreaktion der Megasphären

Eisenreaktion der Megasphären: Mit vernickelten Instrumenten und Glasnadeln wird die Keimscheibe eines frischgelegten unbebrüteten Eies freipräpariert, für 45 Minuten in absoluten Alkohol und danach für 30 Minuten in eine 2proz. frischbereitete Lösung von Ferrocyankalium getan. Danach kommt sie in 0,5proz. Salzsäure. Nach $1^1/_2$—2 Minuten tritt eine Blaufärbung in der Keimwallgegend auf. Will man Schnittserien der Reaktion unterwerfen, so muss man die Schnitte nur mit 50proz. Alkohol aufkleben, da Eiweiss sich löst (Smiechowski).

c) Injektion einer Farbstoffsuspension in den Dottersack

Injektion einer Farbstoffsuspension in den Dottersack eines Hühnereies. Schaper injizierte in den Dottersack 48 Stunden bebrüteter Hühnerembryonen eine Farbstoffsuspension, die aus in physiologischer Kochsalzlösung verteiltem Karminpulver bestand. Die Flüssigkeit wird auf 39° C. erwärmt, als Einstichort ein Punkt 2 cm seitlich vom höchsten Punkt des Eies bei horizontaler Lage desselben gewählt. Die Injektionsrichtung geht horizontal unter die Keimscheibe. Injiziert wird $^1/_4$ ccm. Die Operation muss unter aseptischen Kautelen erfolgen. Die Eier werden noch 3 Tage weiter bebrütet; dann werden Dottersack und Embryonen in absolutem Alkohol fixiert.

Literatur zu Kapitel 10

Boehm u. Oppel, Taschenbuch, IV. Auflage, 1900. — Will, Zool. Jahrb., Abteilg. Anat. Ontog. Bd. 6. — Rabinowitsch, Diss. Berlin 1903. — Loyez, Compt. rend. l'Acad. Sc. Paris. T. 130, 1900. — Auerbach, Sitzungs-Bericht Akad. Wiss. Berlin 1891. — Prenant, La cellule T. 4. — Ballowitz, „Enzyklopädie" Bd. 1, p. 244/245; Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 70, 1901. — Gerhardt, Anat. Anz. Bd. 20. — Nicolas, Arch. Anat. micr. T. 3, 1900. — Oppel, Arch. mikr. Anat. Bd. 39, 1892. — Vay. Anat. Hefte II. — Kupffer, Arch. Anat. Physiol. Anat. Abtlg., 1882, zit. nach Lee u. Mayer, p. 303. — Mitsukuri, zit. nach Lee u. Mayer. Grundzüge, p. 303. — Mehnert, Morph. Arb. Schwalbe. Bd. 1, 1892. — Voelzkow, Abh. Senckenb. naturf. Gesellsch. Frankfurt a. M. Bd. 26, 1902. — Gregory, Zool. Jahrb. Abtlg. Anat. Ontog. Bd. 13, 1900.

Carl Ernst v. Baer, Entwicklungsgesch. d. Tiere. Königsberg 1828 bis 1837, p. 3/4. — L. Gerlach, Anat. Anz. Bd. II, 1887. — Boehm u. Oppel,

Taschenbuch, IV. Auflage, 1900. — Duval, Annal. Sc. nat. Zoologie, 6. sér. T. XVIII. 1885. — Éternod, Guide technique, IIe Edition. Genève-Bale-Lyon 1898. — Kionka, Anat. Hefte Bd. 3, 1894. — Nowack, Diss. Berlin 1902. — Féré, Journ. l'Anat. et de la Physiol., 1900. — Koller, Arch. mikr. Bd. 20. — Mitrophanow, Arch. Zool. expér. 1896, Anat. Hefte Bd. 12, 1899. — His, Die erste Entwicklung d. Hühnchens im Ei. Leipzig 1868. Arch. Anat. Physiol. Anat. Abtlg. 1877. — Vialleton, Anat. Anz. Bd. 7, 1892. — Abraham, Anat. Hefte Bd. 17, 1901. — Rabl, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 11, 1894. — Suschkin, zit. nach Lee u. Mayer, Grundzüge, p. 300. — Smiechowski, Anat. Hefte II. — Schaper, Anat. Anz. Bd. 22.

Kapitel 11

Säugetiere

Künstliche Befruchtung. Die künstliche Befruchtung ist mit Erfolg von Spalanzani, Schenk, Ott und Grusdew unternommen worden.

Künstliche Befruchtung

Spalanzani befruchtete eine Hündin auf künstlichem Wege, indem er Sperma in die Vagina injizierte.

1. nach Spalanzani

Schenk experimentierte an Kaninchen; er gibt an, dass man bei ihnen dann die meisten befruchtungsfähigen Eier findet, wenn die Tiere jung sind und kurz vor dem Werfen stehen. Er entnimmt dem Graaf'schen Bläschen das Ei und bringt es rasch auf einen auf 30—40° C. angewärmten Objektträger, der dann auf ein geheiztes Mikroskop gelegt wird. Durch schnelles Untersuchen des Eies innerhalb des Liquor folliculi, dem ein Tropfen Schleim aus den weiblichen Geschlechtswegen zugesetzt wird, überzeugt man sich davon, ob das Ei reif ist. Nach Bischoff ist das Kaninchenei reif, wenn es nach dem Verlassen des Follikels von spindelförmigen und radiärgestellten Follikelzellen umgeben ist. Diese Beobachtung, deren Richtigkeit Hensen bestreitet, kann als Anhalt dienen. Schenk hat im Verlauf seiner Experimente als weiteres Charakte-

2. nach Schenk

(Reife der Eier)

ristikum für die Reife des Säugetiereies gefunden, dass die das Ei umgebenden Epithelzellen bei einem reifen Ei so locker sitzen, dass sie durch Spermatozoen und Uterinschleim auf der lebenden Uterinschleimhaut in 2—5 Stunden entfernt werden. Er bringt die Eier nämlich, nachdem er sich von ihrer Reife (nach Bischoff) überzeugt hat, auf die Schleimhaut des frischen aufgeschnittenen Uterus des Tieres, dessen Eier untersucht werden. Dann setzt man ihnen Sperma hinzu, das aus dem Samenleiter und den Samenblasen genommen ist und bringt Uterus + Ei + Sperma in den Brütapparat.

3. nach Ott

Ott gewinnt bei Kaninchen grössere Spermamengen durch Einbinden der Kanüle einer Pravaz'schen Spritze in den freigelegten Samenleiter und durch Reizen des Nebenhodens sowie des Vas def. durch Induktionsströme. Die dadurch entstehenden Kontraktionen treiben Sperma in die Spritze. Dieses wird dann sofort in die Peritonealhöhle in die Nähe der Tuben eingespritzt. Die Spermatozoen gelangen zum Ei auf demselben Wege, auf welchem intraperitoneal injizierte Farbstoffe durch Tuben, Uterus, Cervix in die Vagina kommen.

4. nach Grusdew

Grusdew bringt Eier und Samenfäden in einem besonders konstruierten Röhrchen zusammen und bläst Sperma und Ei durch das Ostium abdominale in die Tube. Die Form seines Röhrchens ist aus nebenstehender Abbildung (Fig. 26) zu ersehen. Im einzelnen gestaltet sich sein Verfahren wie folgt: Zuerst wird die Samenblase ausgeschnitten und in einem Thermostaten bei 37° C. aufbewahrt. Sodann legt man durch Laparotomie einen Eierstock frei. Nachdem in das Röhrchen aus der Samenblase Sperma hineingesaugt ist, wird mit demselben Röhrchen aus einem Graaf'schen Bläschen das Ei aufgesaugt. Nun bindet man das Röhrchen in das Ostium abd. der Tube ein und bläst vorsichtig den Inhalt desselben in die Tube hinein. Dann Abbinden der Tube an ihrem abdominalen Ende und ebenso Abbinden des einen Uterushornes.

Fig. 26.[1])

[1]) Vergl. Arch. Anat. Entwickelungsgesch. 1896 p. 272.

Eier
1. Frische Untersuchung

Eier. Isolierte Säugetiereier kann man sich leicht verschaffen, wenn man ein Graaf'sches Bläschen durch Anstechen oder Aufschneiden öffnet und den Inhalt auf einen Objektträger austreten lässt. Um das Ei lebend zu untersuchen, erwärmt man vorher den Objektträger auf 30—40° und legt ihn auf ein heizbares Mikroskop. Als Einschlussflüssigkeit kann man Liquor folliculi nehmen, dem nach Schenk ein Tropfen Schleim aus den weiblichen Genitalien zugesetzt wird. Brass verwendet als Einschlussmittel Lymphe, die eine Spur von kohlensauren Natron und zwar ungefähr $^1/_2$ pro Mille enthält. Zur Konservierung der Eier kann das Verfahren von Schweigger-Seidel dienen, der Ovula vom Schafe in: Glyzerin pur. 1, Aq. dest. 9 aufhebt, oder dasjenige von van Beneden, nämlich Behandeln mit 1 proz. Osmiumsäure und Härten in Müller'scher Flüssigkeit 3 Tage lang.

2. Fixation

(Kriterien für die Gesundheit der Eier nach Nagel)

Nur diejenigen Eier sind als gesund anzusehen, wie Nagel angibt, die aus Follikeln stammen, die 1. prall gefüllt sind, 2. eine Membrana granulosa mit Vakuolen und die auf die Bereitung von Liquor hinweisende Metamorphose der Follikelzellen zeigen, 3. eine Basalmembran, eine Tunica int. und ext. und sinuöse Bluträume in ihrer Umgebung besitzen.

Eierstöcke
1. Fixation

Eierstöcke. Zur Fixation sind verwandt worden:

1. Müller'sche Flüssigkeit. Nagel bei Menschen. Er legt die Objekte für 4—6 Wochen in die mehrmals zu wechselnde Müller'sche Flüssigkeit ein; wäscht in fliessendem Wasser bis zur neutralen Reaktion, dann in destillirtem Wasser aus und härtet in Alkohol. Nach Tafani ist aber (Maus) Müller'sche Lösung ganz ungeeignet; ebenso ist nach H. Rabl Müller'sche Flüssigkeit mit Formolzusatz unzweckmäfsig.
2. Sublimat. Nach Tafani für Mäuse in Lösung von 36 g auf 1 Liter Aq. dest. Nach Rabl als in Kochsalzlösung gesättigte Lösung. Ferner unter Zusatz von Essigsäure als
3. Sublimat-Eisessig.
4. Sublimat-Alkohol-Eisessig: Sublimat, konz. in 0,5 proz. Kochsalzlösung, 15, abs. Alkohol 5, Eisessig 1 (Winiwarter für Kaninchen und Mensch).

5. Pikrin-Sublimat-Eisessig: konz. wässerige Pikrinsäure, konz. wässeriges Sublimat aa. Auf 50 ccm dieses Gemisches 1 ccm Eisessig (Sobotta für Kaninchen).
6. Zenker'sche Flüssigkeit.
7. Von den osmiumhaltigen Gemischen hauptsächlich das Flemming'sche Chrom-Osmium-Essigsäuregemisch. Hierbei erwähnt Sobotta, dass man (Kaninchen) den Osmiumgehalt nur schwach nimmt und vor der Fixation, die 24 Stunden währt, tiefe Einschnitte vom Hilus her macht. Ferner das Hermann'sche Gemisch.
8. Flüssigkeit von Tellyesniczky.

2. Untersuchung der Zona pellucida
a) nach Retzius
b) nach Calleja

Untersuchung der Zona pellucida. Zur Erforschung des Baues und der Entwicklung derselben fixiert Retzius mit 0,5 bis 2 proz. Osmiumsäure oder mit dem Flemming'schen Gemisch und färbt mit Rosanilin oder Hämatoxylin-Safranin. Eine sehr distinkte Färbung der Zona ergibt das Verfahren nach Calleja. Hierbei kommen die Schnitte:

1. in Karmin . . . . 2,0 g
   Lithiumkarbonat, ges. wässerige Lösung 100,0 g

auf 5—10 Minuten,

2. in Salzsäure-Alkohol:
   70 proz. Alkohol 100
   Salzsäure 1

auf 5—10 Sekunden,

3. in Wasser zum gründlichen Auswaschen der Salzsäure,
4. in Indigkarmin . . . . 0,25 g
   ges. wässerige Pikrinsäure . . . . 100,0 g

auf 5—10 Minuten,

5. in verdünnte Essigsäure (auf 10 ccm Wasser 5—6 Tropfen Eisessig),
6. in Wasser zum gründlichen Auswaschen der Essigsäure.
7. in absoluten Alkohol, Xylol, Balsam.

3. Untersuchung des Dotterkernes (nach Henneguy)

Untersuchung des Dotterkernes. Wir folgen den Angaben von Henneguy. Von den Säugern waren die günstigsten Objekte wenige Wochen alte und erwachsene Ratten, neugeborenen Meerschweinchen, Fledermäuse. Nur undeutlich war der Dotterkern wahrzunehmen beim Menschen, einer 4 Monate alten Katze, Embryonen vom Schaf.

Er fehlte beim Kaninchen, Hund, Maulwurf, Kuh, Antilope, Pavian. Will man ihn im frischen Zustande untersuchen, so verfährt man nach der von Pictet für die Spermatozoen der Wirbellosen angewandten Methode. Man versetzt eine 5—10 proz. Lösung von Manganchlorür mit einigen Tropfen einer konz. wässerigen Dahlialösung. Zur Fixierung des Dotterkernes dient die Flemming'sche Flüssigkeit, zur Färbung Safranin, Methylgrün, Gentianaviolett (nach Bizozzero), letztere beide mit Eosin kombiniert, Hämatoxylin und Pikro-Nigrosin.

4. Untersuchung des Corpus luteum
a) nach Sobotta

Untersuchung des Corpus luteum. Folgende von Sobotta angewandte Färbungsmethode ergibt eine verschiedene Färbung der epithelialen und bindegewebigen Elemente, sowie auch nach Fixation mit Osmiumgemischen eine gute Kernfärbung. Sie ist ein modifiziertes Benda'sches Verfahren. Die Beize ist Liq. ferri sulfur. oxyd. 1 : 3—5 H_2O, Färbungsmittel Hämatoxylin, Entfärbungsmittel verdünnte Salzsäure. Und zwar bleiben die Schnitte in der Beize 12—20 Stunden, werden in Wasser gründlich ausgewaschen, in der alkoholischen Weigert'schen Hämatoxylinlösung mit Lithionzusatz für 1 Minute schwarzblau gefärbt und kommen dann in die Salzsäure (1 : 500—1000) und in schwach ammoniakalisches Wasser; dann wieder Auswaschen.

b) nach Rabl

Um die eisenhaltigen Pigmentzellen in dem Corporibus luteis deutlich zu machen, behandelt Rabl die Schnitte mit Ferrocyankalium und Salzsäure und färbt nachträglich die Kerne mit Carm-Alaun.

c) nach Bouin
» Clark
» Cohn

Bouin hat die Beobachtung gemacht, dass bei der weissen Ratte sich bestimmte, mit Osmium geschwärzte Körnungen in Kanadabalsam schon nach 10 Minuten auflösen. Er empfiehlt daher die Montierung der Schnitte in Glyzerin. Clark wandte die Verdauungsmethode von Hoehl und Spalteholz an. Cohn gebrauchte mit gutem Erfolg bei einem Material, das mit Zenker'scher oder Tellyesniczky'scher Flüssigkeit fixiert war, folgende Färbemethoden: phosphor-wolframsaures Hämatoxylin (Mallory), die Hämatoxylinmethode von Plessen und Rabinovicz und die Bindegewebsfärbung (Mallory).

5. Keimepithel und Keimschläuche

Zur Erzielung von Färbungsunterschieden zwischen den Zellen des Keimepithels und der Keimschläuche dient nach Regaud und Policard eine Färbung nach dem Weigert'schen Verfahren:

Beizung mit Cuprum acet., Färbung mit Hämatoxylin, Differenzierung mit der Weigert'schen Differenzierungsflüssigkeit.

Uterus und Placenta

Uterus und Placenta. Nach Maximow sind die ersten Stadien der Placentarentwicklung beim Kaninchen mit dem 11. Tage nach der Begattung abgelaufen. Von da an findet nur eine Weiterentwicklung schon gebildeter Teile statt. Bei dem Herauspräparieren dieser frühen Stadien kann man nach demselben Forscher drei Verfahren einschlagen: 1. Man entfernt die Obplacenta und schneidet mit einer feinen und sehr scharfen Schere die Ectoplacenta, die „ein kleiner dunkelroter hufeisenförmiger Fleck auf der Oberfläche des kissenförmigen Wulstes der Mucosa" ist, heraus und fixiert sie zusammen mit dem Embryo. 2. Man unterbindet das Mesometrium mit seinen Gefässen und dann das Uterushorn auf beiden Seiten der Eikammer. So kann man die ganze Eikammer mit Erhaltung der natürlichen Blutfülle herausnehmen. Nachdem sie im ganzen 5 Minuten in der Fixierungsflüssigkeit verweilt hat, wird an der antimesometralen Uteruswand ein Einschnitt gemacht, um das weitere Eindringen der Fixierungsflüssigkeit zu erleichtern. 3. Man unterbindet das Mesometrium und spaltet vor der Fixation die Uteruswand an ihrer antimesometralen Seite der Länge nach.

In den älteren Stadien (nach dem 11. Tage nach der Begattung) entfernt Maximow die ganze Obplacenta. Sodann zerschneidet er die Placenta und Periplacenta durch senkrecht zu ihrer Oberfläche und der Längsachse des Uterushornes geführte Schnitte in mehrere Scheiben und fixiert sie mit der ebenfalls zerschnittenen Obplacenta zusammen.

Bei der Maus schnitt Burckhard um die Anheftungsstelle des Eies zu untersuchen, die Uterushörner heraus und fixierte sie in toto.

Bei älteren Fruchtsäcken, besonders der Raubtiere, fixieren Heinricius, Fraenkel, Kolster, Bonnet dieselben in toto, wobei sich vor allem das 4proz. Formol bewährte, das mütterliche und kindliche Teile gut in situ erhält. Heinricius besonders hebt hervor, dass sich beim Durchschneiden der Fruchtsäcke und bei der Entfernung des Embryos vor der Fixation die Placenta leicht vom Uterus löst.

Zum Studium der Gefässverteilung kann man nach Waldeyer die Gefässe des Uterus mit Berlinerblau-Gelatine unter vor-

sichtigem, mäfsigem Druck, der nur bis zur halben Füllung der Gefässe fortgesetzt werden darf, injizieren, oder man chloroformiert nach Bonnet das Tier zu Tode, bindet die Gefässe des Uterus ab, steckt die Fruchtkammer auf Korkplatten und fixiert so auf 2 Stunden. Dann öffnet man die Kammer durch einen ohne Druck geführten Tangentialschnitt und fixiert weiter.

Ähnlich verfährt O. Schultze, der nach Abbindung der Gefässe den ganzen Uterus für eine Viertelstunde in starker Flemming'scher Lösung fixiert und dann unter Kochsalzlösung von der mesometralen Seite aus Muskulatur und Schleimhaut in vier Zipfeln zurückpräpariert.

Fixation

Fixation. Kolster gibt an, dass man das Auswaschen nach der Fixation nicht zu lange und nicht zu energisch vornehmen darf, weil dadurch leicht kleine und lockere Teile fortgeschwemmt werden. Ausser der erwähnten 4 proz. Formollösung, die sich besonders zur Erhaltung der topographischen Verhältnisse eignet, kommen folgende Fixationsmittel zur Verwendung:

1. Müller'sche Flüssigkeit; nach Heinricius bei Hund und Katze. Nach einem genügend langen Aufenthalte in diesem Fixierungsmittel brachte er die Präparate nach der Altmann'schen Methode zuerst so lange in eine 0,5 proz. Lösung von Kalialaun, bis sie zu Boden sanken; dann auf 2—3 Tage in Hämatoxylin (Böhmer) 1 Teil — 0,5 proz. Kalialaunlösung 5 Teile. Darauf zur Nachfärbung in 0,5 proz. Eosinlösung (Alkohol und Aq dest. aa) schliesslich in Alkohol. Bonnet warnt beim Hunde vor der Anwendung der Müller'schen Flüssigkeit.
2. Sublimat. Auch mit diesem Fixierungsmittel erhielt Bonnet unbefriedigende Resultate, während Kolster es verwendbar findet.
3. Pikrinsublimat. Burckhard bei der Maus. Es ist nach ihm gut, die Präparate gleich in Alkohol zu bringen (vergl. oben die Notiz über das Auswaschen).
4. Zenker'sche Flüssigkeit. Über ihre Brauchbarkeit sind alle Forscher einig; besonders, wenn sie warm (37°) angewendet wird. So empfiehlt sie Maximow, Burkhard, Bonnet und ganz besonders Kolster.

5. Von den Osmium haltigen Lösungen werden angewandt die Flemming'sche und Hermann'sche Flüssigkeit und die Flüssigkeit von Podwyssozki (Maximow).

Einige besondere Methoden
a) Färbung
b) Nachweis des Eisens
c) Nachweis des Fettes

Einige besondere Methoden. Klebs empfiehlt zur Färbung eine Kombination von Delafield'schem Hämatoxylin und Orange 2 L oder Ponceau 4 R, Kolster polychromes Methylenblau nach Unna mit Differenzierung in Glyzerinäther, ferner zum Nachweise des Eisens Ferro- und Ferricyankalium + Salzsäure. Nach demselben Forscher genügt es, um die Fettverteilung zu studieren, nicht, Formolpräparate einfach nachzuosmieren, indem man sie in das Flemming'sche oder Marchi'sche Gemisch bringt, sie müssen vielmehr erst 1 Woche in Müller'scher Flüssigkeit liegen, bevor sie in die Marchi'sche Lösung kommen. Es ist ferner von Vorteil, Müller'sche und Marchi'sche Flüssigkeit bei Bruttemperatur einwirken zu lassen.

Spermatozoen
1. Frische Untersuchung

Spermatozoen. Zur frischen Untersuchung der Samenkörperchen nimmt man das Sperma aus den Samenblasen oder dem Vas def. Als Verdünnungsmittel der Samenfl. kann dienen phys. Kochsalzlösung, Humor aqueus, Jodserum (M. Schultze), das „nicht nur die Bewegung (der Spermatozoen) erhält, sondern auch anregend wirkt," ferner

Glyzerin	1
Aq. dest.	9

(Vergl. Schweigger-Seidel)[1]).

2. Bestimmung der Zahl derselben

Zur Bestimmung der Anzahl der Spermatozoen wandte Lode den Blutkörperchen-Zählapparat von Thoma-Zeiss an. Er verdünnte dabei das Sperma mit 2 promilliger Kalilauge auf das 4—5 fache. Hierdurch werden die Konturen der Samenkörperchen deutlicher, beigemengte Zellen quellen auf. Um gleichzeitig eine Färbung der Köpfe zu bekommen, vermischte er die Kalilauge mit der gleichen Menge einer 1 proz. Methylenblaulösung oder einer verd. Lösung von übermangansaurem Kali. Die Centrifugierung des Samens sowie die Feststellung seines spezif. Gewichtes nach der

[1]) Andere Zusatzflüssigkeiten sind nach Schminke (Arch. mikr. Anat. Bd. 63): 1 proz. Essigsäure und mit Methylenblau versetzte physiolog. Kochsalzlösung, die nach Bardeleben zur vitalen Färbung dient, sowie Jodjodkaliumlösung.

Methode von Hammerschlag kann nach Lode keinen sicheren Anhalt geben für die Zahl der Spermatozoen.

3. Ausstrich- und Schnitt-präparate

Zur Herstellung von Dauerpräparaten dienen Ausstrichpräparate, bei denen die Samenkörperchen entweder durch Antrocknen oder durch Einwirken von Sublimat oder Osmiumsäure (Meves) fixiert werden.

Um Schnittbilder reifer Samenfäden zu bekommen fixiert Meves kleine Stückchen des Nebenhodens in Sublimat, Osmiumsäure, Flemming'scher und Hermann'scher Flüssigkeit und mikrotomiert sie.

Will man Ausstrichpräparate färben, so ist es gut, das Sperma stark zu verdünnen, am besten mit Aq. dest. jedenfalls nicht mit phys. Kochsalzlösung, weil die beim Verdunsten derselben zurückbleibenden Salzkrystalle stören. Zur Färbung können alle gebräuchlichen Tingierungsmethoden verwandt werden, nur ist die Färbbarkeit der Spermatozoen erschwert, weshalb Hämatoxylin z. B. in der Wärme einwirken muss.

Hoden

1. Frische Untersuchung

Hoden. Zur frischen Untersuchung des Hodens kann nach La Valette St. George dienen: 1. Humor aqueus desselben Tieres, 2. Jodserum, 3. 2—3 stündige Behandlung mit 0,1 proz. Osmiumsäure, 4. 2—3 stündige Behandlung mit einer 5 proz. Lösung von molybdäns. Ammoniak.

2. Vorbereitung des Hodens zur Fixation

Herrichtung des Hodens zur Fixation. Man präpariert den Hoden heraus und fixiert ihn in toto oder man legt Hoden und Samenleiter bis hinauf zum Leistenkanal frei, bindet das Vas def. ab, durchschneidet es oberhalb der Ligatur und legt Hoden, Nebenhoden und Samenleiter unzerteilt in die Fixierungflüssigkeit (Plato). Man kann auch ohne Schaden (was Lenhossék Hermann gegenüber betont) grössere Testikel vor der Fixation in einzelne Scheiben zerschneiden; die dadurch herbeigeführte Lockerung und Lageveränderung der einelnen Zellen, die Hermann beträchtlich fand, ist nach Lenhossék nicht so bedeutend. Er und Regaud und andere injizieren ferner einen Teil der Fixierungsflüssigkeiten in den Hoden, entweder interstitiell oder subalbugineal. Regaud hebt hervor, dass man, wenn es sich um eine Untersuchung des Bindegewebes handelt, keine interstitielle Injektion machen dürfe, weil das Bindegewebe dabei zerstört wird. Die Einspritzung unter die Albu-

ginea nimmt man nach ihm so vor, dass man die Kanüle vorsichtig an der Basis einer Falte einsticht und tangential vorschiebt, und ferner nur ein paar Tropfen injiziert, diese Operation aber an verschiedenen Stellen wiederholt. Die Injektionsmenge beträgt 1—2 ccm; man bedient sich einer Pravazspritze oder einer aus Glas hergestellten Spritze (Lüer-Malassez) mit einer Platin-Iridiumkanüle (Regaud). Als zweckmässigste Injektionsflüssigkeiten kommen hauptsächlich Hermann'sche und Flemming'sche Lösung in Betracht. Lenhossék macht in den mit einer der beiden Flüssigkeiten injizierten Hoden nach einer halben Stunde tiefe Einschnitte, fixiert ihn so eine Viertelstunde weiter, zerteilt ihn dann in Scheiben und lässt diese weiter eine Zeit lang in der Fixierungsflüssigkeit verweilen. Regaud injiziert starke Flemming'sche Lösung; präpariert dann, wenn der Hoden eine derbe Konsistenz erlangt hat, die Albuginea ab und legt den ganzen Hoden in ein grosses Quantum Tellyesniczky'scher Flüssigkeit.

3. Fixierungsmittel

Fixierungsmittel. Als solche sind mit Erfolg verwandt worden:

1. Hermann'sche Flüssigkeit. Sie dringt nach Hermann bei unzerteilt und uninjiziert fixierten Hoden nur 3—5 mm in die Tiefe, aber diese schmale Rindenzone ist sehr gut brauchbar. Nach Lenhossék aber sind die besten Bilder sehr oft gerade mehr in der Tiefe zu finden. v. Korff auch f. Phalangista.
2. Flemming'sche Flüssigkeit. Sie wird entweder allein oder in Verbindung mit der Lösung von Tellyesniczky angewandt. Regaud, (siehe oben).
3. Sublimat. Nach Heidenhain ist es zur Fixation vollkommen ungeeignet. V. Lenhossék aber gibt an, man solle sich eine in 0,5 proz. Kochsalzlösung gesättigte Lösung herstellen, und diese bei 35° C. (auf dem Paraffinofen) 24 Std. lang auf den in Scheiben zerschnittenen Hoden (Ratte) einwirken lassen. Auch die Alkoholbehandlung nehme man bei gleicher Temperatur vor. Da die Stücke leicht steinhart werden, so vermeide man den absol. Alkohol bei der Einbettung. Sublimat fixiert hauptsächlich die ruhenden Kerne.

4. Sublimat-Alkohol-Eisessig (Lenhossék)[1]. Dieses Gemisch fand v. Lenhossék sehr brauchbar, wenn es bei 30—35° C. auf die Hodenstückchen 24 Std. einwirkt. Es fixiert nach ihm besonders gut die Mitosen. Regaud gibt an, dass, wenn man das Lenhossék'sche Mittel genau nach der Vorschrift des Erfinders anwendet, der Hoden ungemein schrumpft, dass man dagegen bessere Resultate erhält, wenn das Gemisch kalt angewendet wird und die Präparate aus demselben sofort in 60 proz. Jodalkohol kommen. Es ist nach demselben Forscher ferner zweckmässig, die Mischung erst beim Gebrauch herzustellen, um die Bildung von Essigäther zu vermeiden. v. Lenhossék für Ratte; Schönfeld für Stier, v. Korff auch für Phalangista.
5. Flüssigkeit von Bouin. Sie muss nach Regaud frisch bereitet werden, wirkt 12—14 Std. ein; die Präparate kommen dann in Wasser und 60 proz. Alkohol. Die Zellen werden gut, Blut und Bindegewebe schlecht fixiert. Ratte (Regaud).
6. Die beiden Gemische von G. Niessing. C. Niessing für Meerschwein, Maus und Ratte.
7. Sublimat-Platinchlorid-Eisessig nach v. Lenhossék. Besonders zur Untersuchung der Sphäre.
8. Pikrin-Essigsäure. Bardeleben für den Hoden des Menschen.
9. Zenker'sche Flüssigkeit.
10. 80 proz. Alkohol. Auf eine Stunde; dann wird derselbe erneuert und nach kurzer Zeit durch allmählich verstärkten Alkohol ersetzt. (Beissner).
11. Flüssigkeit von Tellyesniczky. Fast alle Forscher loben dieses Fixiermittel. Regaud wendet es allein oder in Verbindung mit Flemming'scher Flüssigkeit an (siehe oben). Die Präparate bleiben darin 24 Std. oder bis zu 3 Tagen, dann wäscht man aus, oder bringt sie erst noch für einige Tage oder selbst Wochen in eine

[1] Sublimat conc. wässr. 75.
Alcohol abs. 25.
Eisessig 5.

3 proz. Kaliumbichromatlösung; letzteres Verfahren ist besonders wichtig für die Färbung nach der alten Weigert'schen Methode zur Darstellung der Sekretionsprodukte (Regaud).

12. Flüssigkeit von Podwyssozki. Die zerschnittenen Hoden beiben in derselben 3—4 Tage; dann auswaschen in Wasser, schliesslich Alkohol.

4. Einige besondere Methoden zur Untersuchung des Hodens

Einige besondere Methoden zur Untersuchung des Hodens.

I. Safranin-Pikrinsäure

I. Färbung mit Safranin-Pikrinsäure.

Die Schnitte kommen aus dem Aq. destillata in

Starke wässerige Safraninlösung $^1/_2$—1 Std.
Aq. dest. zum Abspülen.

Nun werden sie in zweifacher Weise weiter behandelt:

Sie kommen entweder in

0,1 proz. Salzsäure-Alkohol .	10—20 Sek.
Absolut. Alkohol	kurze Zeit
Strohgelbe alkohol. Pikrins. .	10—15 Sek.
Alkohol abs., Nelkenöl, Balsam.	

oder in

Starke alkohol. Pikrinsäure . .	1—2 Min.
Alkohol abs., Nelkenöl, Balsam.	

(Podwyssozki, zitiert nach Brazzola).

II. Safranin-Gentianaviolett (Hermann)

II. Färbung mit Safranin-Gentianaviolett nach Hermann.

Beide Farbstoffe sind nach folgender Vorschrift in Anilinwasser gelöst:

Farbstoff 1,0; Alkohol abs. 10,0; Anilinwasser 90,0.

Die Schnitte bleiben in:

der Safraninlösung	24—48^h
Aq. dest.	kurze Zeit
Saurer Alkohol, Alkohol abs. } nach Flemming	„ „

Der Farbstoff darf nicht so weit ausgezogen werden, dass die Präparate brauchbar sind.

Aus dem abs. Alkohol in die
Gentianaviolettlösung . . . . 3—5 Min.
dann Weiterbehandlung nach der Gram'schen Methode:
Alkohol
Jodjodkaliumlösung (Jod 1, Jodkali 2, Aq. dest. 300) . . . . auf 1—3^h
Alkohol, Xylol, Balsam.

III. Färbung mit Safranin-Gentianaviolett-Orange nach Flemming.

III. Safranin-Gentianaviolett-Orange (Flemming)

Die Schnitte kommen in

1. Safraninlösung, wässrig od. schwach alkoholisch, mit etwas Anilinw. versetzt . 2—3 Tage
2. Aq. dest.
3. Alkohol abs. entw. neutral oder mit $^1/_{10}$ Prozent Salzsäure versetzt } kurze Zeit (Abspülen).
4. Aq. dest.
5. wässrige Lösung von Gentianaviolett 1—3 Std.
6. Aq. dest.
7. Lösg. v. Orange G. in Wasser einige Min.
8. abs. Alkohol, Nelkenöl (Bergamottöl), Balsam.

IV. Färbung mit Safranin-Gentianaviolett-Orange nach Reinke.

IV. Safranin-Gentianaviolett-Orange (Reinke)

Die Schnitte kommen in
Kal. sulfurosum, konz. Lösg. . 24^h
Aq. dest. . . . . z. Abspülen
Safranin . . . . 1—2^h

Dann in ein folgendermafsen hergestelltes Gemisch von Gentianaviolett und Orange G. Man stellt sich zwei konz. Lösungen in Wasser, eine von Gentianaviolett, die andere von Orange G. her. Zu einem Teil der Gentianaviolettlösung fügt man einige Tropfen der Orange-Lösung. „Das Mischungsverhältnis muss derartig sein, dass ein Tropfen auf Löschpapier gebracht, einem blauen oder blaubraunen Fleck mit schwach orangefarbenen Rand bildet." Es bildet sich ein neuer Farbstoff, der die Lösung trübt. Durch Verdünnung mit Wasser wird sie wieder klar. Die erhaltene Färbungsflüssigkeit darf nicht filtriert werden. In derselben verweilen die Schnitte 24 St. Dann kommen sie auf kurze Zeit in Aq. dest., Alkohol, Nelkenöl, Balsam.

V. Kupfer-Hämatoxylin (Benda)

V. Färbung mit Kupfer-Hämatoxylin (Benda).

Siehe Seite 21.

VI. Safranin-Lichtgrün (Säureviolett) nach Benda

VI. Färbung mit Safranin-Lichtgrün (Säureviolett) Benda.

Siehe Seite 25.

VII. S. Fuchsin-Pikrinsäure (Landel)

VII. Färbung nach Landel mit S. Fuchsin und Pikrinsäure.

Citiert nach Félizet et Branca.

Die Schnitte kommen in eine erwärmte gesättigte Lösung von S. Fuchsin in Anilinwasser bis zum Aufsteigen von Dämpfen. Dann Abspülen in Wasser, Eintauchen in folgende Pikrinsäurelösung: Pikrinsäure in gesättigter wässriger und alkoholischer Lösung aa. Langsame Entfärbung in absolut. Alkohol; Balsam.

VIII. Centrosom und Achsenfaden

VIII. Zur Färbung des Centrosoms und des Achsenfadens.

Eisenhämatoxylin (Heidenhain) mit Erythrosinnachfärbung. Vergl. v. Lenhossék.

IX. Sphäre

IX. Zur Färbung der Sphäre

1. Hämalaun (P. Mayer) . . . 1—2 Tage; Nachfärbung mit Erythrosin.
2. Reine Magentarotfärbung nach Fixation mit Sublimat-Platinchlorid-Eisessig.

Vergl. v. Lenhossék.

X. Hämatein-Safranin (Rabl)

X. Färbung mit Hämatein und Safranin (Rabl); nach den Angaben von Regaud.

Man bekommt die besten Bilder nach der Fixierung in Essigsäure-Bichromat (Tellyesniczky). Der Vorgang ist der folgende:

Färbung mit Hämatein.
Auswaschen in Wasser.
Färbung mit Alaunsafranin (Zwaardemaker) 24^h
Auswaschen in Wasser.
Salzsäure-Alkohol 1:2000 — 1:3000.
Alkohol.
Nelkenöl-Xylol-Balsam.

Sehr gut wird auf diese Weise das Chromatin dargestellt.

XI. Färbung nach der alten Weigert'schen Methode zur Darstellung des Sekretionsproduktes der Samenzellen (Regaud).

XI. Sekretionsprodukt der Samenzellen

Färbung mit Hämatoxylin nach Beizung mit Kupferacetat und folgender Differenzierung mit der Borax-Blutlaugensalzmischung.

Die Objekte müssen in chromhaltiger Flüssigkeit fixiert sein; die Präparate werden in Kanadabalsam oder in Cedernöl ohne Deckglas aufgehoben.

XII. Imprägnation der Membran der Samenkanälchen nach Regaud.

XII. Membran der Samenkanälchen

2 Methoden:

1. Zerzupfung des Hodens in Arg. nitricum (1 : 500).
   Abspülen in Aq. dest.
   Aufbewahren in Glyzerin.
2. Interstitielle Injektion der Renaut'schen Flüssigkeit.
   Pikrinsäure konz wässr. . . . 80 } 3 Vol.
   Osmiumsäure 1 proz. . . . . 20 }
   Silbernitrat 1 proz. . . . . . 1 Vol.
   Fixation mit 93 proz. Alkohol.

Zerlegung des Hodens in dicke Scheiben, die in Nelkenöl oder Canadabalsam aufbewahrt werden.

Fortpflanzung. Maus. Wir folgen den Angaben von Sobotta: Die Brunst tritt sowohl unmittelbar nach dem Wurf als auch am 21. Tage (21×24 Stunden) post partum ein. Sie erstreckt sich über den grössten Teil des Jahres; am regsten ist sie im April und Mai und von Mitte August bis Ende September, aber „auch im Dezember, Januar und Februar erlischt sie nie ganz". Bei brünstigen Tieren klafft die Vagina, während sie sonst durch Verklebung fest verschlossen ist; „ihre Ränder sind gerötet und (oft stark) geschwollen." Die Dauer der Trächtigkeit umfasst 20 Tage; die Jungen werden 3 Wochen von der Mutter gesäugt. Da nun die Maus am 21. Tage nach dem Wurf wieder brünstig wird, so tritt die Brunst und eventuelle Begattung zu einer Zeit ein, wo die Jungen selbständig werden und die Mutter entbehren können. Die höchste Zahl derselben beträgt 12.

Fortpflanzung 1. Maus

Bei völlig sprungreifen Follikeln ist das Epithel an einer Stelle stark verdünnt, fast geschwunden, an der gegenüberliegenden Seite aber verdickt unter einer eigentümlichen reihenförmigen Anordnung der Zellen. Der Liquor gerinnt bei der Fixierung nicht körnig (wie bei noch nicht sprungreifen Follikeln), sondern mehr oder weniger deutlich in Fadenform.

Die Begattung findet nachts oder in den frühen Morgenstunden statt. Sie ist schwer zu beobachten. „Selbst die zahmsten Mäuse werden oft durch Beobachtung an der Ausführung des Aktes verhindert, insbesondere scheint das brünstige Weibchen alsdann den Bock nicht anzunehmen.“ „Der ganze Begattungsakt vollzieht sich in kaum 1 Minute.“ Nach erfolgter Begattung liegt in der Vagina der sogenannte „Vaginalpfropf“, der aus erstarrtem Samenblasensekret besteht. Er bleibt 20—30 Stunden liegen und fällt dann aus der Scheide heraus. Wenn dies geschehen ist, kann es vorkommen, dass das Tier noch einmal belegt wird.

Die durch die Begattung gesetzten Veränderungen am Uterus beschreibt Sobotta folgendermaſsen: „Die vor der Brunstzeit eng kontrahierten, schon während derselben leicht ausgedehnten Hörner stellen unmittelbar nach der Begattung 2 prall gefüllte Schläuche dar, deren Wandungen durch die Ausdehnung stark verdünnt und vollkommen durchsichtig geworden sind. Diese pralle Füllung des Uterus dauert eine Reihe von Stunden und nimmt dann allmählich ab. Nach 10—12 Stunden hat das Organ bereits wieder die Grösse erreicht, die es vor der Begattung hatte.“

2. Kaninchen

Kaninchen. Die Brunst tritt gleich post partum ein; sie dauert nach den Angaben von Rein für Strassburg und Hensen für Kiel von Ende März bis Mitte oder Ende Juli. Ob ein Kaninchen dem Werfen nahe ist, erkennt man nach Weil daran, dass es sich die Haare zum Nestbau ausreisst. Erkannt wird die Brunst an dem aufgeregten Wesen des Weibchens: es springt und läuft im Käfig ohne sichtbare Ursache hin und her, springt auch auf andere Weibchen und macht Begattungsbewegungen, „die Geschlechtsteile sind stark geschwollen und gerötet, die Schleimhaut derselben wird sukkulent. Bei der Berührung scheinen die Geschlechtsteile sehr empfindlich zu sein und nimmt das Tier dabei nicht selten eine charakteristische Körperstellung wie bei der Kopulation an“ (Rein und Bischoff). Die Laute, die das brünstige

Weibchen oft beim Herannahen des Männchens ausstösst, sind für das Vorhandensein von Brunst nicht beweisend; man hört sie auch bei schwangeren und nicht brünstigen Weibchen (Rein).

Die vollzogene Begattung erkennt man „an dem charakteristischen und heftigen Sprunge des Männchens nach hinten am Ende des Aktes" (Rein). Manchmal fällt danach der Bock auf die Seite und liegt eine Weile ruhig mit dem Weibchen zusammen da (Weil und Rein). Nach der ersten Begattung folgen noch eine Reihe andere, oft $1^1/_4$ Stunden lang. Ein Vaginalpfropf findet sich ebenso wie bei der Maus. Nach Maximow ist es für eine erfolgreiche Begattung von Wichtigkeit, dass die Kaninchen nach dem vorhergehenden Wurf nicht gesäugt haben.

Die Tragzeit des Kaninchens ist 30 Tage. Ein Wurf umfasst gewöhnlich 5—7 Junge.

3. Meerschweinchen

Meerschweinchen. Die Brunst tritt ebenfalls gleich nach dem Wurf ein; sie wird wie bei dem Kaninchen an dem Gebaren des Weibchens erkannt; das Verklebt- oder Nichtverklebtsein der Vagina hat nach Rein nichts Charakteristisches für Fehlen oder Vorhandensein der Brunst. Das Meerschweinchen wirft 2—3mal im Jahre; die Anzahl der Jungen bei einem Wurf ist 2—5. Diese sind nach 5—6 Monaten fortpflanzungsfähig, nach 8—9 Monaten sind sie vollkommen ausgewachsen. Die Begattung findet bei einem stark brünstigen Weibchen und einem kräftigen Bock meist sogleich nach Zulassung des Männchens statt. Das Ende derselben wird auch hier an den eigentümlichen Bewegungen des Männchens erkannt. Die Tiere wiederholen die Begattung 3—4mal. Ein Vaginalpfropf ist vorhanden (Rein). Die Geburt des Meerschweinchens erfolgt 9 Wochen nach der Befruchtung (Bischoff).

4. Katze

Nach A. Fleischmann: „Embryologische Untersuchungen" ist die Brunst der **Katze** nicht sicher zu erkennen. Fleischmann hielt die Weibchen im Käfig vom Männchen isoliert. Ab und zu setzte er den Zuchtkater hinein und sperrte ihn dann mit demjenigen Weibchen zusammen in einen besonderen Käfig, das sich die Annäherung hatte gefallen lassen Hier fand dann oft sofort die Begattung statt. Ihr Ende und, dass sie erfolgreich gewesen, erkennt man an der Gewohnheit der Weibchen, „sich auf dem Rücken zu wälzen, nachdem sie den Kater in sehr energischer



Weise mit Krallen uud Zähnen fortgewiesen hatten." Die Tragzeit ist 7—8 Wochen (Böhm und Oppel).

5. Hund

Hund. Die Hündin ist zweimal im Jahre läufig, im Februar und August. Dieser Zustand dauert 9—14 Tage. Die Tragzeit ist 63 Tage, die Anzahl der Jungen beträgt gewöhnlich 4—6 (Brehm's Tierleben).

6. Reh

Reh. Beim Rehbock fangen die Hoden im Frühjahre an zu schwellen; dieser Prozess dauert bis Juni, Juli, August. Zu dieser Zeit sind ungemein reichlich Spermatozoiden im Samen enthalten. Im Herbst bildet sich der Hoden zurück und im November, Dezember, Januar enthält er keinen Samen und keine Spermatozoiden mehr (Bischoff).

Die Begattung findet Ende Juli und im August statt. Die Eier bleiben nach der Befruchtung von Ende Juli oder Anfang August bis über Mitte Dezember in einem sich nicht ändernden primitiven Zustande, um sich dann dafür später mit erhöhter Geschwindigkeit weiter zu entwickeln. Diese von Ziegler, dann von Bischoff aufgestellte Lehre von der Ruhepause in der Entwickelung von August bis Dezember ist nachher noch von Retzius, Keibel u. a. angenommen worden. Nach den neuesten Untersuchungen von Keibel jedoch ist nachgewiesen, dass der erwähnte Stillstand in der Entwickelung nicht vorhanden ist. Die Rehe paaren sich im Juni, Juli, August, doch kommen auch Fälle späterer Brunst vor; sie werfen im Mai oder Juni.

7. Schwein

Schwein. Tragzeit 16—18 Wochen. Paarung: Anfang April und im September. Anzahl der Jungen 4—6, 12—15, 20 bis 24 (Brehm's Tierleben).

8. Schaf

Schaf. Tragzeit 20—25 Wochen; Anzahl der Jungen 1—4. Die Brunst beginnt im März und währt den Sommer hindurch (Brehm's Tierleben).

9. Opossum

Opossum. Bei der brasilianischen Beutelratte soll die Brunst in die Monate Oktober, November, bei Didelphys virg. in die Zeit von Ende Februar bis Mitte April fallen. Sie findet normaler Weise nur einmal im Jahre statt. Die Begattung erfolgt in den frühen Vormittagsstunden. Nimmt man dem Weibchen die Jungen gleich nach der Geburt aus dem Beutel oder gelingt die Begattung des Männchens nicht, so tritt nach 4—6 Wochen, spätestens aber

Anfang Juli noch einmal Brunst ein (Selenka). Die Geburt in den Beutel erfolgt ungefähr 14 Tage nach der Begattung; die Embryonen sind dann noch klein und formlos und erst nach 50 Tagen vollständig ausgebildet. Sie verlassen den Beutel erst dann, wenn sie die Grösse einer Ratte erreicht haben. Die Zahl der Jungen beträgt 4—16. (Brehm.)

Gefüttert werden die Beutelratten am besten mit Fleisch und aufgequollenem Maismehl. Sie verschmähen auch nicht Milch, Eier und Obst. Ich erhielt Exemplare durch die zoologische Grosshandlung von Aug. Fockelmann in Hamburg-Hoheluft[1]).

Jüngere Entwicklungsstadien (Beschaffung des Untersuchungsmateriales)

Jüngere Entwicklungsstadien. Das Eindringen des Spermatozoons in das Ei erfolgt bei der Maus 6—10 Stunden nach der Begattung (Arch. mikr. Anat. Bd. 45, Sobotta). In einer späteren Arbeit (Ibidem Bd. 62) verlegt Sobotta bei einer in der Nacht stattfindenden Begattung die Befruchtung in die Zeit von 4—6 Uhr morgens. Vorkerne findet man 18—22 Stunden nach der Begattung, 2 Furchungskugeln nach 26 Stunden, 4 Furchungskugeln nach 50 Stunden, 8 nach 60 Stunden, 16 nach 72 Stunden. Im ganzen verweilt das Ei in der Tube ungefähr 80 Stunden (Sobotta). Bei anderen Säugetieren umfassen diese Entwickelungsstadien folgende Zeiten. Man findet 1. das Stadium der Vorkerne beim Kaninchen 14 Stunden, beim Meerschweinchen 12 Stunden nach der Begattung (Rein). 2. 2 Furchungskugeln beim Kaninchen nach 21 Stunden (Hensen), beim Meerschweinchen nach 22—24 Stunden (Sobotta). Es verweilen in der Tube das Kaninchenei ebenso wie das Ei vom Meerschweinchen ca. 80 Stunden, das Hundeei 8—10 Tage (Bischoff).

Für das Opossum gibt Selenka an, dass die Furchung 5×24 Stunden nach der Begattung eintritt und im Uterushorn stattfindet. — Wenn bei der Maus die Eier aus dem Eileiter in den Uterus gelangen, sind sie zwar alle kleinzellig gefurcht, befinden sich aber durchaus nicht auf dem gleichen Entwickelungs-

[1]) Die Einrichtung einer Beutelrattenzucht, die sich augenblicklich noch in den ersten Versuchsstadien befindet, wurde mir durch die Überlassung eines Stipendiums aus den Mitteln der Louise Bose-Stiftung ermöglicht, für welches ich dem Kuratorium meinen ergebenen Dank ausspreche.



stadium. Die Furchungshöhle tritt im Laufe des 4. Tages auf und hat am Ende des 5. Tages eine ansehnliche Grösse erreicht (Sobotta).

Beim Kaninchen kann man auf Gastrulastadien 7 Tage nach der Begattung rechnen.

Lage der Eier im Uterus

Lage der Eier im Uterus. Bei der Maus sind die Eier aus der Mitte des 4. bis Ende des 5. Tages in keiner bestimmten Weise zur Längsachse des Uterus orientiert, wohl aber ist das der Fall bei den älteren Stadien. Hier liegen sie nämlich senkrecht zur Längsachse des Uterus, so dass man bei Querschnitten des Uterus genaue Längsschnitte der Eier bekommt. Immer aber liegen die Eier in den antimesometralen Buchten; ebenso beim Maulwurf und Igel. Bei älteren Kanincheneiern liegt nach Bischoff und O. Schultze die Embryonalanlage in der mesometralen Hälfte der Fruchtkammer, beim Hunde ist nach Bonnet die Lage des Embryo nicht fest bestimmt.

Präparation der Eier

1. nach Rein (Kaninchen)

Auspräparieren der Eier. Rein schneidet, wie vor ihm Bischoff, beim Kaninchen die Tube der Länge nach auf und faltet sie auseinander. Nun sieht man manchmal das Ei schon mit blossem Auge; ist das nicht der Fall, so schabt man mit einem stumpfen Messer die Tubenwand vorsichtig ab. In dem so erhaltenen Tubenschleim findet man leicht das Ei. O. Schultze spritzt durch den Eileiter vom Uterinende aus 4mal 0,6 proz. Kochsalzlösung in 4 mit konkavem und geschwärztem Boden versehene Schalen, so dass sich in jeder Schale 1 ccm Flüssigkeit befindet. Das Ei wird dann mit Hülfe von zugespitzten Fetzen schwarzen Papiers auf den Objektträger befördert. Beim Meerschweinchen ist nach Rein das Aufschneiden der Tube infolge ihrer dünnen Wand nicht möglich; hier muss man den Inhalt der Tube vorsichtig auspressen, wie es Bischoff getan hat. Dasselbe Verfahren empfiehlt Ballowitz für kleine Säugetiere. Die Uteruseier des Meerschweinchens gewinnt Graf Spee, wie O. Schultze die Tubeneier der Kaninchen, durch Ausspritzen des Uterushornes von seinem Vaginalende her mit verdünnter $^3/_4$ proz. Kochsalzlösung. Er legt das Horn nach Abtrennung von der Vagina mit einem Stück Eileiter vom Mesometrium frei und spannt es eine kurze Zeit unter Wasser durch Feststecken mit Nadeln, damit alle Falten ausgeglichen werden, in die sich die Eier während des Ausspritzens

2. nach O. Schultze (Kaninchen)

3. nach Rein (Meerschweinchen)

4. nach Graf Spee (Meerschweinchen)

festsetzen könnten. Alles Blut muss aus dem am Horn noch festsitzenden Mesometrium entfernt werden, damit es sich nicht der ausgespritzten Flüssigkeit beigesellt und dadurch das Auffinden des Eies unmöglich macht. Vor dem Ausspritzen trennt man das Uterushorn von dem noch ansitzenden Eileiter, muss aber darauf achten, dass „die Uterushöhle wirklich eröffnet werde. Bei genauer Besichtigung erkennt man gewöhnlich leicht, dass der Eileiter sich in die Uterusmuskulatur etwa 1 bis 2 mm hinein fortsetzt, ehe er in das Ende des viel weiteren Cavum uteri exzentrisch einmündet. Lässt man dieses Stück Eileiter daran, so gelingt die Ausspritzung der Eier ganz gewöhnlich nicht, weil sich das sehr feine Eileiterlumen verstopft. Man läuft dann Gefahr, dass der unter dem Injektionsdrucke sich immer praller füllende Uterus irgendwo platzt, das Ei hier heraustritt und verloren geht".

5. nach O. Schultze (Kaninchen)

Für ältere Kanincheneier empfiehlt O. Schultze folgende Verfahren:

1. Gastrulae, die frei im Uterus liegen. Man entnimmt dem chloroformierten Tiere den ganzen Geschlechtsapparat, befreit dann den Uterus vom Eierstock, Eileiter und Mesometrium und öffnet ihn und seine Hörner entlang der Ansatzstelle des Mesometriums unter 0,6 proz. Kochsalzlösung auf einem Teller mit schwarzer Wachsschicht, an welche die Uterushälften mit Nadeln befestigt werden. Dabei fallen die Eier auf den schwarzen Boden des Tellers.

2. Ältere Gastrulae, die sich als Anschwellungen an der Uteruswand markieren, werden von Muskel- und Schleimhautschicht vorsichtig freipräpariert.

3. Es ist eine Verwachsung zwischen der Fruchtblase und der Uteruswand eingetreten. Die einzelnen Fruchtkammern werden von einander getrennt und $^1/_2$—$^1/_4$ Stunde oberflächlich in starker Flemmingscher Flüssigkeit fixiert. Dann öffnet man sie unter 0,6 proz. Kochsalzlösung an der antimesometralen Seite und übersieht nun die Innenfläche der mesometralen Hälfte, wo die Embryonalanlage liegt. Letztere wird von der Schleimhaut getrennt und weiter fixiert.

6. nach van Beneden-Julin
7. nach Retterer

Van Beneden und Julin öffnen den Uterus unter warmem Kronecker'schen Serum: Aq. dest. 1 Liter, kaust. Natron 0,06, Meersalz 6. Retterer fixiert das Ei in der Weise, dass er nach Öffnen des Uterus und Freilegen des Eies Pikrin-Schwefelsäure so aufträufelt, dass sie zwischen Ei und Uterusfläche fliesst.

8. nach Assheton (Schwein, Schaf)

Beim Schwein und Schaf verwendet Assheton die folgende Methode, um die Eier aus dem Uterus zu erhalten: Er bindet die unteren Enden beider Tuben ab, führt in den Muttermund eine Kanüle und füllt Uterus und die beiden Hörner desselben mit 0,25 proz. oder 0,5 proz. Chromsäurelösung prall an. Nun wird um das Orificium uteri eine Ligatur gelegt; auf 1—3 Tage kommt dann der Uterus in dieselbe Chromsäurelösung, wie sie zur Injektion verwandt worden war. Danach lässt man den Inhalt desselben in eine Schale ausfliessen und wäscht den Uterus selbst gründlich. Seinen Inhalt sowohl wie das Waschwasser untersucht man mikroskopisch auf die Anwesenheit von Eiern. Dasselbe Verfahren gebraucht Keibel beim Reh; nur setzt er der 0,25 proz. Chromsäure noch einige Tropfen Essigsäure hinzu. Beim Schwein öffnet er die Uteri in der Weise, dass er an der Antimesometralseite die Muscularis bis auf die Schleimhaut entfernt. Nun giesst er zu den Objekten 4 proz. Salpetersäure oder Pikrin-Schwefelsäure und zerreisst in derselben die Schleimhaut. Fleischmann isoliert bei der Katze in physiologischer Kochsalzlösung. „Das Auslösen der Keimblase geschieht ohne Schwierigkeit, wenn man die Uteruskammer nicht an der kugeligen Oberfläche, sondern an den beiden Stellen zuerst anschneidet, wo sie in den runden nicht trächtigen Teil des Uterusschlauches übergeht und von hier aus die Entfernung der Muskulatur und der Schleimhaut betreibt. Die Schnitte müssen jedoch so geführt sein, dass an beiden Polen gleich die Wand der Keimblase völlig freigelegt ist.“ Selenka legt bei Didelphys den Uterus erst auf einige Minuten in absoluten Alkohol, um die Muskulatur abzutöten und zu härten, ehe er ihn öffnet. Bonnet öffnet beim Hund den Uterus unter physiologischer Kochsalzlösung, die auf 37—38° C. erwärmt ist, sucht die Eier auf und bringt sie dann schnell in die Fixierungsflüssigkeit. Er hat keinen schlechten Einfluss der Kochsalzlösung auf die Eier gesehen, über den Keibel beim Schwein klagt.

9. nach Keibel (Reh Schwein)
10. nach Fleischmann (Katze)
11. nach Selenka (Didelphys)
12. nach Bonnet (Hund)

Weiterbehandlung isolierter Eier. Dabei bewährt sich nach O. Schultze der Dialysator von F. E. Schulze. Rein fixiert und färbt nach der Methode von van Beneden: Die Eier kommen der Reihe nach in 0,1—1 proz. Osmiumsäure, Müller'sche Flüssigkeit (2—3 Tage); dann entweder in Glyzerin oder in Wasser zum Auswaschen, schliesslich in Alaunkarmin oder Safranin. Nach Ballowitz ist hierbei der Aufenthalt in Müller'scher Lösung unnötig; man fügt nach ihm der Kochsalzlösung, in der das Ei liegt, einige Tropfen einer 1 proz. Osmiumsäure hinzu und setzt es Osmiumdämpfen aus; dann: erst verdünntes, schliesslich stärkeres Glyzerin. Zur Versilberung behandelt Van Beneden das lebende Ei mit $^1/_3$ proz. Höllensteinlösung für $^1/_2$—2 Minuten und setzt es dann im Wasser dem Lichte aus. Für Schnittpräparate fixiert er das Ei 24 Stunden mit Chromsäure 1 : 400; dann Auswaschen, Alkohol. Bonnet empfiehlt für Keimblasen und Embryonalschilde des Hundes Fixation mit gesättigter Sublimat-Kochsalzlösung. O. Schultze wendet zur Fixation der Blastulae, Gastrulae und Keimblätter an 1. 3 proz. Salpetersäure für $^1/_2$—1 Stunde, dann 70 proz. Alkohol, der zweimal gewechselt wird für 24 Stunden. 2. Pikrin-Schwefelsäure 3—6 Stunden, 60 proz. Alkohol 24 Stunden, 70 proz. Alkohol 24 Stunden, 80 proz. Alkohol, der so lange gewechselt wird, bis er farblos bleibt, 3. Chrom-Essigsäure, nach der man in Wasser auswäscht, 4. Flemming'sche Flüssigkeit, die man verschieden stark mit Wasser verdünnen oder der man zur besseren Färbbarkeit Pikrin-Schwefelsäure zusetzen kann. Die Uteruseier des Meerschweinchens behandelt Graf Spee ohne jede weitere Vorbereitung mit Pikrokarmin nach Weigert. Fleischmann fixiert das durch Kochsalzlösung isolierte Ei in Pikrin-Schwefel-Chromsäure (siehe Seite 205).

Weiterbehandlung isolierter Eier
1. nach Rein
2. nach Ballowitz
3. nach Van Beneden (Versilberung und Schnittpräparate)
4. nach Bonnet (Hund)
5. nach O. Schultze (Kaninchen)
6. nach Graf Spee (Meerschweinchen)
7. nach Fleischmann

Fixation jüngerer Entwicklungsstadien im Zusammenhang mit den weiblichen Geschlechtswegen. Robinson fixiert bei der Maus die ganzen Uteri nebst Inhalt in Pikrinschwefelsäure, Pikrinsalpetersäure oder Pikrinsalzsäure. Dauer der Fixation einige Stunden; dann auswaschen in Methylalkohol. Sobotta empfiehlt zur Fixierung der Tuben mit Eiern bei der Maus das Rabl'sche Pikrinsublimat und, wenn es sich um die Untersuchung feinerer Kernstrukturen handelt, das schwache Flemming'sche Gemisch, während er vor der An-

Fixation jüngerer Entwicklungsstadien im Zusammenhang mit den weiblichen Geschlechtswegen
1. nach Robinson (Maus)
2. nach Sobotta (Maus)

wendung der Kleinenberg'schen Pikrinschwefelsäure und des konzentrierten Sublimates warnt. Während letzteres die Ovarien gut fixiert, lässt es die Eileitereier schrumpfen. In dem schwachen Flemming'schen Gemisch lässt er die Objekte 24 h, wäscht dann aus und bringt sie durch die Alkoholreihe in Paraffin. Für die im Uterus sich abspielenden Entwickelungsstadien verwendet er die Zenker'sche Fixierungsflüssigkeit, die er sehr rühmt, auch was die Schneidbarkeit der Uterusmuskulatur betrifft. Es wurden die ganzen Uterushörner auf 24 h fixiert, nachdem vorher zwischen den Anschwellungen tiefe Einschnitte gemacht worden waren.

3. nach Fleischmann (Katze)

Fleischmann fixiert den Uterus + Ei der Katze in kochende Pikrin-Schwefel-Chromsäure (vergl. Seite 205), präpariert dann die Muskulatur fort und lässt Schleimhaut und Ei noch in der kalten Flüssigkeit eine Zeit lang.

4. nach Böhm und Oppel

Böhm und Oppel empfehlen zur Fixation der trächtigen Uteri mitsamt ihrem Inhalt das Carnoy'sche Alkohol-Chloroform-Eisessiggemisch.

5. nach Schönfeld (Kaninchen)

Schönfeld legt die Uteri der Kaninchen für $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde in $^1/_2$ proz. Chromsäure, zerschneidet sie dann, wenn das Blut koaguliert ist, und fixiert weiter mit der Hermann'schen Flüssigkeit.

6. nach Graf Spee (Meerschweinchen)

Graf Spee bringt das Uterushorn vom Meerschweinchen zur Darstellung scharfer Zellkonturen in halb oder ganz gesättigte Sublimatlösung auf 12 bis 24 Stunden oder injiziert eine solche in die Uterusgefässe. Dann kommt das Objekt nach flüchtiger Abspülung in Wasser in 0,5 proz. Osmiumsäure im Dunkeln, darauf in fliessendes Wasser und wie gewöhnlich in Alkohol und Jodalkohol und wird mit Hämatoxylin (Delafield) gefärbt.

7. nach Ballowitz

Ballowitz empfiehlt zur Fixierung von Uteri, die Keimblasen enthalten und nicht eröffnet werden, folgende Mischung:

Sublimat, in der Wärme gesättigt . .	500
4 proz. Formollösung	200
absoluter Alkohol	300
Eisessig	25

Verhalten der Zona pell. den Fixierungsmitteln gegenüber

Verhalten der Zona pellucida den Fixierungsmitteln gegenüber. Graf Spee und van Beneden geben an, dass sich beim Meerschweinchen die Zona in Säuren löst und dass man deshalb bei ihrer Untersuchung keine sauren Fixationsmittel anwenden dürfe. Dem pflichtet Sobotta bei der Maus nur für den Fall bei, dass

sich die Zona im Stadium beginnender Auflösung befindet, also schon dünn zu werden anfängt. Hier ist es dann möglich, dass das Verschwinden der Zona durch ein saures Fixierungsmittel beschleunigt wird, sonst aber ist es ganz gleich, ob man säurehaltige oder säurefreie Fixierungsmittel anwendet.

Ältere Entwicklungsstadien
Fixation

Ältere Entwicklungsstadien. Zur Fixation derselben können die folgenden Mittel dienen:

1. In erster Linie das Alkohol-Chloroform-Eisessiggemisch nach Carnoy. Es fixiert in kurzer Zeit 12 bis 15 Minuten, doch schadet auch ein längerer Aufenthalt (bis zu 24 Stunden) nichts; dann abs. Alkohol. Die topographischen Verhältnisse sind gut erhalten, ebenso Kerne und Zellen gut fixiert. Dasselbe Gemisch empfiehlt Neumayer für Schafembryonen.
2. Zenker'sche Lösung. Sie fixiert in der Wärme (ca. 37°) besser als in der Kälte; nach Retterer ist es von Vorteil, den Eisessiggehalt nur zu 3 % zu nehmen. Man soll die Säure erst kurz vor dem Gebrauch hinzufügen.
3. Sublimat, in Kochsalzlösung gesättigt.
4. Sublimat-Eisessig.
5. Pikrin-Sublimat nach Rabl.
6. Pikrin-Essig-Sublimat.
7. das Gemisch von Winiwarter: Sublimat in 0,5 proz. Kochsalzlösung gesättigt 50, 95 proz. Alkohol 50, 1 proz. Platinchlorid 20, Eisessig 5. Fixationsdauer 6 Stunden.
8. Pikrin-Schwefelsäure.
9. Pikrin-Schwefelsäure in Verbindung mit Chromsäure: a) Pikrin-Schwefelsäure mit $^1/_{10}$ Prozent Chromsäure. Selenka für Opossum, Fleischmann für Katze, b) Pikrin-Schwefelsäure mit $^1/_3$—1 Prozent Chromsäure. Keibel für Schwein.
10. Formol (Formalin), a) in 3 proz. Lösung (O. Schultze), b) in 4 proz. Lösung (Kohn), c) in der Mischung von 1 Teil Formalin auf 3 Teile Wasser: Schönemann für Kaninchen- und Katzenembryonen; letzterer bringt seine

Objekte dann nach 24^h noch auf 12 Stunden in eine in Kochsalzlösung gesättigte Sublimatlösung.

11. Salpetersäure in 3 proz, 4 proz. und 10 proz. Lösung.
12. Müller'sche Flüssigkeit. Letztere beiden Fixierungsmittel nach einander angewandt, sind nach Henneberg sehr geeignet zum Studium der äusseren Embryonalform. O. Schultze empfiehlt zu dem gleichen Zweck Chromsäure allein oder in Verbindung mit Essigsäure, Osmiumessigsäure, Pikrinsäure und Pikrinschwefelsänre. Man soll nach ihm die Untersuchung in der Säure oder in Wasser vornehmen.

Einigebesondere Methoden
a) Färbung der Becherzellen

Einige besondere Methoden. Um die Becherzellen in der Darmschleimhaut bei ihrem ersten Auftreten sichtbar zu machen, nimmt Voigt bei Schweineembryonen, die mit Zenker'scher Flüssigkeit fixiert sind, folgende Doppelfärbung von Hämatoxylin (Boehmer) und Bismarckbraun (Casella, Frankfurt) vor.

Die Schnitte kommen:

in Hämatoxylin auf 1^h
in dest. Wasser zum Abspülen.

In folgende Bismarckbraunlösung:

Bismarckbraun . . . . 3,0 gr.
Aq. destillata . . . . 50,0 ccm.
Glyzerin . . . . 50,0 „ für 1 Std.
in Salzsäure-Alkohol nur kurze Zeit,
in Wasser, Alkohol etc.

b) Anfertigung von Totalpräparaten

Um gefärbte Totalpräparate jüngerer und älterer Entwickelungsstadien (Katze) zu erhalten, färbt Fleischmann mit Boraxkarmin (Grenacher), der mit 35 proz. Alkohol zu einer hellroten Flüssigkeit verdünnt war, mehrere Tage oder Wochen und behandelt dann ebensolange mit angesäuertem Alkohol.

c) Färbung mit Boraxkarmin-Bleu de Lyon nach Tonkoff

Um die Gewebe ganz junger Embryonen zu differenzieren, verwendet Tonkoff folgende Modifikation der bekannten Boraxkarmin-Bleu de Lyonfärbung. Er fügt der Lösung des Bleu de Lyons im 96 proz. Alkohol einige Tropfen Jodtinktur zu oder behandelt die Schnitte erst mit einer dünnen Jodlösung im 96 proz. Alkohol ehe er sie in die Bleu de Lyonlösung bringt.

Literatur zu Kapitel 11

Spalanzani, siehe Hermann's Handbuch der Physiol., Bd. 6., T. 2. Hensen Physiol. d. Zeugung. — Schenk, Mitt. a. d. embryol. Institut Wien, Bd. 1, 1880. — Ott, Zentralbl. Gynaekol. 1882, No. 36. — Grusdew, Arch. Anat. Physiol. Anat. Abtlg., 1896. — Brass, Zeitschr. wiss. Mikrosk., Bd. 1, 1884. — Nagel, Arch. mikr. Anat., Bd. 31. — Tafani, ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., Bd. 7. 1890. — Rabl, Arch. mikr. Anat., Bd. 54, 1899, Anat. Hefte H. 34/35. — Winiwarter, Arch. Biol. T. 17, 1900. — Sobotta, Anat. Hefte, Bd. 8, 1897, Arch. mikr. Anat. 47, 1896; Arch. mikr. Anat. 45. — Regaud-Policard. Bibl. anat. 1901, Suppl. — Retzius, ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., Bd. 7. — Calleja, ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., Bd. 15. — Henneguy, Journ. de l'Anat. et de la Physiol. T. 29, 1893. — Pictet, Mitt. Zool. Stat. Neapel, Bd. 10. — Bouin, Bibl. anat. T. 7, 1899. — Clark, Arch. Anat. Entwickelungsgesch. 1898. — Hoehl, Arch. Anat. Entwickelungsgesch. 1897. — Spalteholz, Arch. Anat. Entwickelungsgesch. 1897 Suppl. — Cohn, Arch. mikr. Anat., Bd. 62. — Maximow, Arch. mikr. Anat., Bd. 51/56, 1897/1900. — Burckhard, Arch. mikr. Anat., Bd. 57, 1901. — Fraenkel, Arch. Gynaek., Bd. 55, 1898. — Kolster, Anat. Hefte, Bd. 20, 1903. — Bonnet, Anat. Hefte. Bd. 20, 1903, Anat. Hefte, Bd. 9, 1897. — O. Schultze, Anhang z. Grundriss d. Entwickelungsgesch. d. Menschen und der Säugetiere Leipzig 1897. — Heinricius, Arch. mikr. Anat., Bd. 33/37. — La Valette St. George, Arch. mikr. Anat.. Bd. 15. — Schweiger-Seidel, Arch. mikr. Anat.. Bd. 1. — Lode, Pflüger's Archiv, Bd. 50. — Hammerschlag, Wien. klin. Wochenschr. 1890. — Meves, Arch. mikr. Anat. 1899. — v. Lenhossék, Arch. mikr. Anat., Bd. 51. — Regaud, Arch. Anat. mikrosk. T. 4. — Hermann, Arch. mikr. Anat., Bd. 34. — v. Korff, Arch. mikr. Anat. Bd. 60. — Schönfeld, Bibl. anat., T. 8, Arch. Biol., T. 19. — Bardeleben, Arch. Anat. Entwickelungsgesch. 1897. Suppl. — Beissner, Arch. mikr. Anat., Bd. 51, 1898. — Brazzola, Mem. della R. Accad. Sc. Balogna (4) T. 8/9. — Flemming, Arch. mikr. Anat., Bd. 37. — Reinke, Arch. mikr. Anat. Bd. 44. — Félizet-Branca, Journ. Anat. Physiol., T. 34, 1898. — Rein, Arch. mikr. Anat., Bd. 22, 1883. — Hensen, Arch. Anat. Entwickelungsgesch., Bd. 1. — Weil, Wien. mediz. Jahrb. 1873. — Bischoff, Entwickelungsgeschichte des Kaninchens 1842, Braunschweig, Bischoff, Entwickelungsgesch. des Meerschweinchens, Giessen 1852, Bischoff, Entwickelungsgeschichte des Rehes, Giessen 1854, Entwickelungsgesch. des Hundeeies. Braunschweig 1845. — Brehm, Tierleben; Säugetiere. — Fleischmann, Embryolog. Untersuchungen. Wiesbaden 1889. — Böhm-Oppel, Taschenbuch, IV. Auflage, 1900. — Ziegler, Beobachtg. über Brunst u. d. Embryo. d. Rehe., Hannover 1843. — Keibel, Anat. Anz. Erg. H. 19; Arch. Anat. Physiol. Anat. Abtlg. 1889/1902; Morph. Arb. 1893, Bd. 2. — Selenka, Entwickelungsgesch. der Tiere. Das Opossum. Wiesbaden 1886. — Ballowitz, Encyclopädie, Bd. 1. — Graf Spee, 1) Arch. Anat. Physiol. Anat. Abtlg. 1883; 2) zit. nach Ballowitz, Encyclopädie, Bd. 1, S. 256. — Assheton, Quat. Journ. micr. Sc. N. S., Bd. 41. zit. nach Lee und Mayer S. 297. — van Beneden u. Julin,

Arch. Biol. T. 5, 1885, zit. nach Lee u. Mayer, S. 297. — Retterer, Compt. rend. Biol. Paris (8) T. 4, Compt. rend. de la Soc. de Biol. (10) T. 5, 1898. — van Beneden, Arch. Biol., T. 1, 1880 (ferner: Lee u. Mayer, S. 297). — Robinson, Quat. Journ. micr. Sc. vol. 33, 1892. — Neumayer, Festschrift f. Kupffer, 1899. — Born, Arch. mikr. Anat., Bd. 33, 1889. — Schönemann, Anat. Hefte, Band 18. — Henneberg, Anat. Hefte, H. 41, 1899.

Kapitel 12

Bindegewebe Elastische Fasern Muskulatur Knorpel und Knochen Entkalkung Zähne Gefässsystem und Blut Centralnervensystem

1. Bindegewebe
a) Untersuchungsmaterial

Bindegewebe. Geeignete Untersuchungsobjekte für die Frage nach der Entstehung der Bindegewebsfibrillen sind die folgenden:

1. Von Vogelembryonen nach der Beobachtung von Boll bei Huhn und Möve: die Arachnoides, das subkutane Gewebe der Schädelhaut, das subkutane Gewebe und die Muskelsehnen der unteren Extremität, ferner die Hornhaut. Es müssen aber die Embryonen ein bestimmtes Alter haben. So ist eine erfolgreiche Untersuchung nur innerhalb folgender Brüttage möglich:

Bei der Arachnoides vom	4—19. Tage
bei dem subkut. Gewebe d. Schädelhaut vom .	5—15. „
bei dem subkut. Gewebe d. unt. Extremität vom	7—17. „
bei den Sehnen d. unt. Extremität vom . . .	7—21. „
bei der Kornea vom	4—21. „

Als weitaus das günstigste Objekt bezeichnet Boll die Arachnoides vom 9. und 10. Bebrütungstage. Man untersucht nach demselben Forscher in Amniosflüssigkeit, darf aber ein Objekt nicht

länger als 1 Stunde beobachten, weil es nach dieser Zeit unbrauchbar wird.

2. Säugetierembryonen: 2—22 cm lange Schafembryonen (Lwoff), 15 cm lange Schweinsembryonen (Breslauer), Rindsembryonen von 8 mm bis $5^1/_2$ cm Länge (Breslauer, Flemming); man untersucht Nabelschnur, grosses Netz, Sehnen und subkut. Bindegewebe.

Ferner hat Waldeyer das subkut. Gewebe des Igels als günstiges Objekt kennen gelehrt.

3. Von Teleostiern: Der Dottersack der Salmoniden (Czermak).
4. Von Amphibien nach Zachariadès die gelatinöse Substanz, die beim Frosch die hintere Fläche der Ausstrahlung des Triceps fem. und der Achillessehne bedeckt; nach Flemming bei einer 2—3 cm langen Salamanderlarve die Kiemenblättchen, das parietale Bauchfell, die Lungenwand.

b) Fixation und Färbung nach Boll, Zachariadès, Ognew, Flemming

Fixation und Färbung. Als Fixierungsmittel dient hauptsächlich 0,1—1 prozentige Osmiumsäure; sie wenden Boll, Zachariadès, Ognew u. a. an. Flemming fixiert mit seinem Chrom-Osmium-Essigsäuregemisch, in dem die Objekte mindestens eine Woche, manchmal auch Monate liegen bleiben oder mit der Hermann'schen Flüssigkeit und färbt mit Eisenhämatoxylin (Heidenhain) oder nach seinem Safranin-Gentiana-Orange-Verfahren; ferner empfiehlt er eine starke Durchfärbung mit dem Delafield'schen Hämatoxylin. Zachariadès färbt nach der Fixation in Osmiumsäure, die nur 10 Minuten dauert und nach der das Objekt 24 Stunden in Aq. dest. liegen bleibt, für 24 Stunden mit einer schwachen Lösung von Violett 5 B, das auch Ognew bei älteren Embryonen anwendet.

nach Waldeyer

Waldeyer injiziert subkutan beim Igel Pikrokarmin nach Poljakoff, Ehrlich's Triacidgemisch oder verdünnte Dahlialösung (1 gr auf 1 Liter Aq. dest.) und nimmt die zu untersuchenden Stückchen aus dem dadurch entstehenden Farbödem.

nach Spuler

Spuler untersucht sowohl abgezogene Membranen und Zupfpräparate als auch fixiertes Material. Dasselbe bestand in Embryonen vom Mensch, Katze und Schaf. Als Fixierungsmittel diente mit

gutem Erfolg die Zenker'sche Flüssigkeit, aber mit geringerem Eisessiggehalt als die Originalvorschrift angiebt. Denn nach Merkel ist die Essigsäure nicht indifferent den jungen Bindegewebsfibrillen gegenüber. Merkel sowohl wie Spuler empfehlen ferner zur Fixation die Ramon y Cajal'sche Mischung von doppelt chromsaurem Kali und Osmiumsäure. Lwoff fixiert mit Müller'schen Flüssigkeit; sie muss bei 35° zwei Wochen einwirken; dann wird in Wasser ausgewaschen. Spuler färbt mit Alaun-Campeche, Eisenhämatoxylin und Safranin, als Plasmafarben dienen Eosin und Rubin S. Eine gute Vorschrift zur Färbung des Bindegewebes hat Hansen gegeben: auf 100 Teile einer kalt gesättigten Pikrinsäure kommen 5 Teile einer 2proz. wässrigen Säurefuchsinlösung; dazu kurz vor dem Gebrauch etwas Essigsäure. [1])

nach Merkel

nach Lwoff

nach Hansen

2. Elastische Fasern

a) Untersuchungsmaterial

Elastische Fasern. Die Entwickelung der elastischen Fasern kann nach den bisher vorliegenden Beobachtungen mit gutem Erfolg an den folgenden Orten untersucht werden: Netzknorpel (O. Hertwig); Ligamentum nuchae (Kuskow); Lunge (Lenzi, Linser, Teuffel); Fruchthüllen vom Schwein, Schaf, Kaninchen, Meerschwein; und zwar ist hier das günstigste Objekt das Amnion eines 10—15 cm langen Schweinefötus (Gardner); bei den Mollusken am Mantelrand und Fuss gewisser Lamellibranchiaten; ferner im Herzen des Huhns und am Dottersack der Salmoniden nach Beobachtungen von Gregory. Hierbei färbt O. Hertwig mit Osmiumsäure oder mit Anilinblau nach Ewald, Kuskow fixiert entweder mit Osmiumsäure und färbt dann nach dem Verfahren von Unna oder Lustgarten oder mit dem Flemming'schen Gemisch, an das er eine Färbung mit Viktoriablau 4 B. anschliesst. Ferner wendet er ein Verdauungsverfahren an. Ich verweise hierzu auf die Originalarbeit. Empfehlenswerte Methoden sind ferner die Orcëinmethode nach der Unna'schen Vorschrift, die man nach den Erfahrungen von Gregory sehr gut

b) Fixation und Färbung

[1]) Bei der Färbung verfährt Laguesse (Arch. d'Anat. mikr. T. VI) folgendermaassen: Er nimmt zwei Probirröhrchen von je 3 ccm Inhalt und füllt das eine mit der Säurefuchsin-Pikrinsäure unter Hinzufügen von 1—2 Tropfen einer 2proz. Essigsäure, das andere mit Aq. dest., dem er 2 Tropfen dieser angesäuerten Säurefuchsin-Pikrinsäurelösung zusetzt. Mit dem Inhalt des ersten Röhrchens färbt er 5 Min. und wäscht darauf (2—4 Sek.) mit dem des zweiten. Dann 95proz. Alkohol. Die Hansen'sche Säurefuchsin-Pikrinsäure muss man nach ihm unter Lichtabschluss aufbewahren.

mit der Ehrlich-Biondi'schen Färbung verbinden kann, ferner ganz besonders das neue Weigert'sche Verfahren, entweder nach der Weigert'schen Originalvorschrift, oder indem man sich als Färbungsmittel des Spiegel'schen Kresofuchsin's bedient. Das letztere kann man anwenden in der Vorschrift von Röthig oder in der von Pranter. Bei der Anwendung der Weigert'schen Methode gibt Teuffel an, dass man bei der Lunge nur ganz frisches Material untersuchen dürfe, weil die elastische Faser im jugendlichen Zustand nur wenig dem Fäulnisprozess widersteht.

3. Muskulatur

Muskulatur. Kästner empfiehlt zur Färbung der Fibrillen bei Amphibien und Teleostiern das Eosin, welches dieselben ganz charakteristisch gelbrot färbt. Weiss reizt die Larven von Rana und Axolotl sowie die Embryonen vom Huhn mit dem elektrischen Strom, fixiert sie oder legt sie zum späteren Zerzupfen in Drittelalkohol. Die Schnitte werden mit Hämatoxylin-Eosin, mit Kernschwarz und mit Safranin gefärbt, die isolierten Gewebsstückchen werden entweder mit Pikrokarmin gefärbt und in Pikrokarmin und Glyzerin eingeschlossen oder sie kommen zur Färbung in Methylgrünlösung und dann zur Konservierung in die Flüssigkeit von Ripart und Petit. Regnaud fixiert die glatten Muskelzellen nach Retterer mit Ameisensäure und Alkohol, Motta-Coco die Embryonen von Cavia und Lazerta mit dem Flemming'schen Gemisch, Sublimat oder 2proz. Formollösung und färbt in folgender Mischung: Bibricher Scharlach 1, Hämatoxylin (Paladino) 3. Godlewski gebraucht zur Fixation der Extremitäten- und Herzmuskulatur bei jüngeren und älteren Meerschweinchen, Mäusen, Kaninchen und Salamanderlarven Sublimat mit 2% Eisessig und die Mischung von Carnoy; er färbt mit Hämalaun-Eosin und mit Vanadium-Hämatoxylin. Ganz besonders aber empfiehlt er die Eisenhämatoxylinfärbung, verbunden mit einer Nachfärbung von Eosin oder Bordeaux R. Marceau injiziert in die embryonalen Herzen Zenker'sche Flüssigkeit, bindet sie ab, fixiert sie in derselben weiter für 3 Stunden und lässt sie dann vorsichtig eine Reihe von Alkoholen, die von 10 zu 10° verstärkt sind, passieren. Mac Callum fixiert mit Zenker'scher Flüssigkeit oder Osmiumsäure und bedient sich nach der letzteren des Kolossow'schen Reduktionsverfahrens. Waren die Embryonen mit anderen Mitteln fixiert, so wurden erst die Schnitte dieser Behandlungsmethode unterworfen: sie kamen in

2proz. Osmiumsäure für 3—4 Minuten, dann in die Kolossow'sche Reduktionsflüssigkeit und wurden schliesslich noch mit Safranin gefärbt.

Eine alte Calberla'sche Methode bestand darin, bei Amphibien- und Reptilienlarven die Muskelfasern der quergestreiften Muskulatur chemisch und mechanisch zu isolieren, dann zu fixieren und zu färben. Als Isolationsflüssigkeiten dienten folgende Lösungen:

1. Chlorkalium 1,8
   Chlornatrium 1,2
   Phosphors. Natron 0,8
   Chlorkalcium 0,4
   Schwefels. Magnesia 0,4
   Rhodannatrium 0,1
   Kohlens. Kalk 0,4
   Phosphors Kalk 0,2

auf 556 ccm Wasser; kurz vor dem Gebrauch wird diese Flüssigkeit bis zur Sättigung mit Kohlensäure versetzt. Dann nimmt man 2 Teile dieser Salzlösung, 2 Teile Wasser und 1 Teil Müller'scher Lösung. In der so erhaltenen Mazerationsflüssigkeit bleibt der Embryo 1—2 Tage liegen.

2. Chlorkalium 0,4
   Chlornatrium 0,3
   Phosphors. Natron 0,2
   Chlorkalcium 0,2

auf 100 Teile Wasser. Auch hier wieder Sättigung mit Kohlensäure. Dann mischt man 2 Teile dieser Lösung mit 2 Teilen Wasser und 1 Teil Müller'scher Flüssigkeit. Man kann auch die Müller'sche Flüssigkeit durch eine 2,5proz. Lösung von einfach chromsaurem Ammoniak ersetzen. Nach dem Aufenthalt des Embryos in der Mazerationsflüssigkeit werden seine Elemente mechanisch isoliert und dann einer Einwirkung von 0,5proz. Osmiumsäure ausgesetzt und beliebig gefärbt.

4. Knorpel und Knochen
a) Fixation

Knorpel und Knochen. Zur Fixation dienen die gebräuchlichen Mittel; Retterer empfiehlt besonders zur Fixierung embryonaler Knorpel und Knochen:

1. 3proz. Chromsäure 66 — Formol 33 — Essigsäure 8.
2. Platinchlorid, 5proz., 50 — Formol 50 — Essigsäure 3.
   Fixationsdauer 6—12 Stunden; dann Wasser, Alkohol.

b) Färbung
α) Kresylviolett

Zur Färbung des embryonalen Knorpelskelettes dient Bismarckbraun, Boehmer'sches Hämatoxylin und Kresylviolett RR. Wendet man das Kresylviolett in wässriger Lösung (0,5 auf 200 Aq. dest.) an, so bekommt bei Präparaten, die mit Zenker'scher Flüssigkeit fixiert sind, nach kürzerer oder längerer Zeit der Färbung der Knorpel eine rote Farbe, während die Kerne der Zellen blau tingiert sind.

β) Hämatoxylin

Das Hämatoxylin (Boehmer) färbt den Knorpel nach kurzer Zeit (2 Minuten) blau; man muss aber darauf achten, dass die Präparate nach der Färbung nur flüchtig in Wasser abgespült werden, weil bei längerem Aufenthalt in demselben auch die anderen Gewebe einen diffusen graublauen Ton annehmen. Waren die Objekte vorher mit Boraxkarmin durchgefärbt worden, was zur Erzielung einer guten Kernfärbung empfehlenswert ist, so müssen die Präparate mit besonderer Sorgfalt in HCl-Alkohol differenziert und in Alkohol gründlich ausgewaschen werden, weil man sonst leicht eine Mischfärbung erhält. Nicht jedes Hämatoxylinpräparat färbt den Knorpel, selbst wenn man es nach der Boehmer'schen Vorschrift bereitet hat. Es muss dies an Verschiedenheiten des Rohmateriales liegen. Sehr gut ist die nach der Angabe von Hansen hergestellte Hämatoxylinlösung.

c) Ossifikationspräparate
α) mit Hämatoxylin

Bei der Verwendung des Hämatoxylin zur Herstellung von Ossifikationspräparaten ist die Anwendung des Gerlach-Klaatsch'schen Verfahrens sehr zu empfehlen. Die Objekte sind in Boraxkarmin durchgefärbt, gründlich differenziert, in Alkohol gewaschen und in Paraffin eingeschlossen. Die Schnitte kommen in Wasser, dann bis zum nächsten Tage in eine Mischung des Boehmer'schen Hämatoxylins mit Glyzerin und Wasser, nämlich in:

Aq. dest.	100
Hämatoxylin (Boehmer)	10
Glyzerin	5

Darauf in:

konz. wässrige Pikrinsäure	1
Aq. dest.	3

für 25 Sekunden.

Weiter für kurze Zeit erst in Eisessig, dann in Aq. dest., schliesslich durch die Alkoholreihe in Xylol, Balsam.

Zur Deutlichmachung des Unterschiedes zwischen der periostalen und enchondralen Verknöcherung ändert man dieses Verfahren in der Weise ab, dass man statt Hämatoxylin Methylviolett nimmt, hierin stark überfärbt, dann kurze Zeit in Pikrinsäure, gründlich in Eisessig entfärbt. Man muss aber auf histologische Details verzichten. (Klaatsch).

β) mit Bismarckbraun

Das Bismarckbraun gebraucht man zweckmäfsig in der von Weigert gegebenen Vorschrift: 1 gr Bismarckbraun wird in 100 gr Aq. dest. aufgekocht, dann filtriert; zum Filtrat setzt man $^1/_3$ des Volumens absoluten Alkohol.

Zur Herstellung von Ossifikationspräparaten kombiniert man die Bismarckbraunfärbung mit einer Boraxkarmin-Vorfärbung und einer Nachfärbung in Indigkarmin oder Bleu de Lyon.

1. Boraxkarmin — Bismarckbraun — Indigkarmin.

Die Stücke sind mit Boraxkarmin durchgefärbt. Die Schnitte kommen aus dem dest. Wasser in

Bismarckbraun (Weigert) . . . . . . 3—4 Min.
Leitungswasser . . . . abspülen
85 proz. Alkohol bis die Knorpelfärbung leuchtend braun ist.

55 proz. Alkohol und Aq. dest. Dann in indigschwefelsaures Natron (aus der königl. Hof-Feldapotheke Breslau, Neumarkt 20) für 1 Min. und zwar in folgende Lösung:

konz. wässrige Lösung (n. Filtration) . 20
Aq. dest. 30

95 proz. Alkohol, abs. Alkohol, Xylol.

Waren die Schnitte nicht durchgefärbt, so färbt man sie erst in Boraxkarmin für 2 Min., muss dann aber sehr gut mit mehrmals gewechseltem Salzsäure-Alkohol für 15 Minuten oder länger differenzieren und die Säure gut auswaschen. Dann weiter, wie eben auseinander gesetzt.

2. Boraxkarmin—Bismarckbraun—Bleu de Lyon.

Die Art der Bismarckbraunfärbung ist dieselbe; aus dem Leitungswasser (nach dem Bismarckbraun) kommen die Schnitte erst in Aq. dest., darauf in folgende Bleu de Lyonlösung:

Bleu de Lyon, konz. wässrige Lösung . 10
Aq. dest. 30

Während der mehr der weniger langen Färbung in dieser Lösung müssen die Schnitte tüchtig bewegt werden. Nun gleich in 85 proz. Alkohol, absoluten Alkohol, Xylol.

Färbung mit Boraxkarmin und Indigkarmin nach Merkel-Bayerl.

γ) mit Boraxkarmin-Indigkarmin

Man fertigt sich zwei Farblösungen an:

a) Karmin	2	b) Indigkarmin	8
Borax	8	Borax	8
Aq. dest.	130	Aq. dest.	130

Die Schnitte kommen in eine Mischung von a) und b) zu gleichen Teilen auf etwa 15—20 Min.; dann in eine gesättigte Oxalsäurelösung für 15—20 Min., werden ausgewaschen und durch die Alkoholreihe in Xylol und Balsam gebracht.

Im Betreff weiterer Methoden verweise ich auf den entsprechenden Abschnitt in der Encyklopädie der mikrosk. Technik.

d) Isolation embryonaler Knochen

Zur Isolation embryonaler Knochen verwendet O. Schultze Kalilauge, die in der Wärme einwirkt.

e) »Durchsichtige« Embryonen

α) nach O. Schultze

Zur Anfertigung „durchsichtiger“ Embryonen hat derselbe Forscher ein sehr elegantes Verfahren angegeben. Die Embryonen werden durchsichtig; die Gewebe quellen auf und nur das, was Knochen ist, erscheint glänzend weiss. Die Methode lässt sich aber nur an Alkohol-Material anwenden. Die Embryonen kommen auf mindestens acht Tage in absoluten Alkohol; dann bringt man sie in eine wässrige Lösung von Kali kaustikum; Schultze verwendet 3—5 proz. Lösungen. Nach meinen Erfahrungen sollte man immer 5 proz. gebrauchen. Ist der Effekt erreicht, d. h. treten alle knöchernen Partieen glänzend weiss, auf durchsichtigem Grunde hervor, so kommt das Material zur dauernden Konservierung in

Wasser	100
Glyzerin	30
25 proz. Formol	2.

β) nach Bakay

Bei der Methode von L. Bakay werden die Embryonen ebenfalls durchsichtig gemacht, zugleich aber wird der Knorpel gefärbt, sodass man also, wie bei O. Schultze das knöcherne, jetzt das knorpelige Skelett in allen seinen Teilen zu sehen bekommt. v. Lenhossék sagt darüber folgendes: „Die in Sublimateisessig

oder in Alkohol fixierten Embryonen (bis 15—30 mm Länge) oder Stücke von solchen (Chromsäure oder Chromsalze sind bei der Fixierung zu vermeiden) werden in 96proz. Alkohol gehörig nachgehärtet und dann 2—3 Tage lang mit 3proz. Salpetersäure behandelt, wonach sie während 2—3 Stunden mit einige Male gewechseltem 96proz. Alkohol ausgewaschen werden. Nun überträgt man die Objekte, ohne etwas von den Weichteilen entfernt zu haben, in eine Bismarckbraunlösung, die in der Weise hergestellt ist, dass man der Weigert'schen Bismarckbraunlösung solange 96proz. Alkohol zusetzt, bis sie ganz durchscheinend wird. Die Objekte bleiben je nach ihrer Grösse 12—24 Stunden in dieser Farblösung, wobei sie eine schwache Rosafärbung annehmen. Nun folgt Auswaschen in 96proz. Alkohol solange, bis aus dem Objekt von selbst, ohne dass darauf ein Druck ausgeübt würde, Farbstoffwolken entweichen. Hierauf bringt man die Objekte auf kurze Zeit in absoluten Alkohol und schliesslich in eingedicktes Cedernholzöl, wie es als Immersionsöl benutzt wird. Schon nach etwa 10 Minuten bemerkt man, dass das Objekt durchscheinend zu werden beginnt, wobei darin braungefärbte Stellen sichtbar werden. Dieser Prozess erreicht in 2—3 Stunden seinen Abschluss; jetzt erscheinen die Objekte ganz durchsichtig mit Ausnahme des Knorpelskelettes, das dunkelbraun gefärbt ist und in seiner Gesamtheit in sehr grosser Klarheit und bis in alle Einzelheiten hinein zur Beobachtung kommt. Die verknöcherten Skelettteile bleiben gänzlich ungefärbt und grenzen sich durch scharfe Linien gegen den Knorpel ab. Da die Objekte durch die Behandlung recht hart und widerstandsfähig werden, können sie zur Beobachtung von allen Seiten mit der Pinzette oder Präpariernadel nach Belieben nach allen Richtungen gewendet werden." [1]) Dieses Verfahren bietet noch den Vorteil, dass man dieselben Objekte, da sie ja mit Cedernöl durchtränkt sind, sofort in Paraffin einbetten und schneiden kann.

5. Entkalkung

Entkalkungsmittel.

1. Müller'sche Flüssigkeit.

Entkalkt nur sehr langsam; brauchbar für Embryonen, besonders, wenn zu je 200 bis 300 ccm Flüssigkeit noch 1 ccm Salpetersäure

[1]) Im Prinzip gleich ist die Methode von van Wijhe, die nach den Angaben von Bolk im Petrus Camper 1903 darin besteht, dass die Objekte mit einer angesäuerten alkohol. Lösung von Methylenblau durchtränkt und in HCl-Alkohol entfärbt werden. Sie passieren dann die Alkoholreihe und kommen in Xylol, in dem sie vollkommen durchsichtig werden.

gesetzt wird. Zeitdauer der Entkalkung mehrere Wochen und selbst Monate (Haug).

2. Chrom-Salzsäure

in folgender Verbindung:

Chromsäure	1,0
Salzsäure	1,0
Aq. dest.	100,0

Für junge Knochen geeignet (Haug.) Entkalkt langsam. Nachbehandlung wie bei 3.

3. Chrom-Osmiumsäure

in folgender Mischung:

1proz. Chromsäure	25 ccm
1proz. Osmiumsänre	10 „
Aq. dest.	65 „

Dann Auswaschen in 70proz. Alkohol im Dunkeln. Häufiges Erneuern der Flüssigkeit. Entkalkt schonend, doch langsam und beeinträchtigt Fixation und Färbung (Haug).

3a. Chromsäure und Salpetersäure:

Acid. chrom.	1,0 gr
Acid. nitric.	2 ccm
Aq. dest.	200 ccm

nach Stowel. Dann auswaschen.

4. Pikrinsäure:

a) in geättigter wässriger Lösung, b) in gesättigter wässriger Lösung unter Zusatz von 3—5 Prozent Salpetersäure. Für fötale Knochen geeignet. Entkalkung nur langsam (Haug).

5. Milchsäure:

In 10proz. Lösung; für embryonale Knochen sehr geeignet (Haug).

6. Phosphorsäure:

In 5—10proz. Lösung. Sehr langsame Entkalkung; beeinträchtigt die Färbung.

7. Acidum pyrolignosum purum.

Unverdünnt zu gebrauchen. Für fötale Knochen; Entkalkung langsam (Haug).

8. Salzsäure.

a) In 0,5 bis 10 proz. Lösungen; die Grundsubstanz des Knochens quillt leicht auf. Um dies zu vermeiden, Zusatz von Kochsalz nach von Ebner: 100 ccm kalt gesättigter Kochsalzlösung werden mit 100 ccm Aq. dest. und 4 ccm Salzsäure vermischt. Dahin das Objekt; täglich Zusatz von 1—2 ccm Salzsäure, bis der Knochen ganz weich ist. Langes Auswaschen in Wasser. Keine Neutralisation mit Ammoniak, da die Farben sich schlecht halten (Haug).

b) Alkoholische Kochsalz-Salzsäurelösung (v. Ebner):

Acid. muriat.	2,5
Alkohol	500,0
Aq. dest.	100,0
Kochsalz	2,5

c) Alkoholische Kochsalz-Salzsäurelösung (nach Haug):

Acid. muriat.	1,0—5,0
Alkohol	70,0
Aq. dest.	30,0
Kochsalz	0,5

Entkalkung langsam; will man schneller zum Ziele kommen, Erhöhung des Säuregehaltes auf 5—10 %; dann muss man aber auch den Kochsalzgehalt bis auf die Hälfte der Salzsäuremenge steigern; gute Erhaltung der Gewebe. Notwendig gründliches Auswaschen (Haug).

9. Salpetersäure.

a) In 2—5 proz. wässriger Lösung; wirkt an sich nicht quellend; das tritt erst ein, „wenn man die Säure beim Auswaschen verdünnt“ (Schaffer). Daher müssen die Objekte vor dem Auswaschen in ein „Entsäuerungsmittel“ kommen. Solche sind 5 proz. Lösungen von Lithium- oder Natriumsulfat. Aufenthaltsdauer in der Salpetersäure 12—24 Std., im Entsäuerungsmittel ebenso lange. Dann Auswaschen in fliessendem Wasser 48 h. Sehr zweckmäſsig ist es, das Objekt vor der Entkalkung in Celloidin einzuschliessen und mit dem Celloidinmantel zusammen der Entkalkungsprozedur zu unterwerfen (Schaffer).

b) Entkalkungsmittel nach Haug:

Acid. nitric. pur. (Spec. Gew. 1,5—1,2)	3,0—9,0
Alkohol abs.	70,0
Aq. dest.	30,0
Chlornatrium	0,25

Für fötale, jugendliche und erwachsene Knochen. Schnelle und schonende Entkalkung. Beschleunigung derselben bei Einwirkung in der Wärme. Sehr brauchbar, wenn mehrfach-Färbungen angewandt werden sollen (Haug).

c) Entkalkung nach Thoma:

Alkohol 95 proc.	5
Conc. Acid. nitric. (officinell)	1

Die Säure wird entfernt dadurch, dass die Objekte nach der Entkalkung in 95 proz. Alkohol kommen, der präzipitierten Kalk im Überschuss enthält.

10. Phlorogluzin.

Entkalkt selbst nicht, sondern schützt nur die Gewebe.

a) Phlorogluzin-Salpetersäure. 1 g Phlorogluzin werden in 10 ccm reiner nicht rauchender Salpetersäure (spez. Gew. 1,4) vorsichtig und langsam so lange erwärmt, bis die Farbe der Lösung dunkelrubinrot wird. Dazu 50 ccm Aq. dest Man kann das Flüssigkeitsquantum bis auf 300 ccm erhöhen, muss dementsprechend aber auch die Salpetersäuremenge steigern, da der Säuregehalt immer 20 % betragen muss. Über 300 ccm darf man nicht hinausgehen, weil dann das Phlorogluzin seine schützende Wirkung verliert. Entkalkung sehr rasch (Haug).

b) Phlorogluzin	1,0
Acid. nitricum	5,0
Alkohol	70,0
Aq. dest.	30,0

Diese Mischung entkalkt weniger schnell, aber gut und sicher (Haug).

c) Phlorogluzin mit Salzsäure. Der Säuregehalt muss bis zu 40 % betragen; so für Batrachier 5—10 %, für Chelonier und Vögel 10—20 %, für Säugetiere 20—40 %. Ausserdem muss Kochsalz in einer Menge von 0,5 % in der Flüssigkeit enthalten sein (Andeer

und Haug). Nach Andeer ist dieses Verfahren nur bei Knochen anwendbar, die Carbonate und Phosphate enthalten, dagegen nicht für Conchyolin, Chitin, Keratin, Spongin und Spongilin.

11. Trichloressigsäure.

In 2,5, 3,0 und 4,0 proz. wässriger Lösung. Nicht nach Material, das in Alkohol gelegen hat. Entkalkungsdauer 24—48 Std., unter häufigem Wechseln der Flüssigkeit. Gründliches Auswaschen in fliessendem Wasser.

12. Schwefelige Säure.

Schönemann gibt an, dass die Knochen während des Aufenthaltes in der Säure hart sind und erst beim Auswaschen weich werden.

6. Zähne
a) Fixation

Zähne. Zur Fixation der Kiefer können dienen:

1. Pikrinsäure-Sublimat-Eisessig, wobei die Pikrinsäure zugleich etwas entkalkend wirkt.
2. Nach Graf Spee ein Gemisch von 0,5—1,5 proz. Chromsäure und 0,5 proz. Osmiumsäure.
3. Die von Hoehl angegebenen Methoden, nämlich:
   1. Fixation mit 96 proz Alkohol mit oder ohne Zusatz von 0,2—0,5 % Acid. picronitricum oder 0,5 bis 1 % Eisessig. Dauer der Fixation 48 Std., dann Alkohol. Färbung der Schnitte nach Ogata[1]) zur Darstellung der Kerne.
   2. Sublimat in physiologischer Kochsalzlösung gesättigt. Die Flüssigkeit wird auf 37° C. erwärmt. In der langsam erkaltenden Flüssigkeit bleiben die Objekte 24^h. Dann Wasser, Alkohol, Paraffin. Färbung der Schnitte nach Heidenhain-Krause oder nach Ogata.[1])
   3. Chrom-Osmium-Essigsäuregemisch:

      1 proz. Osmiumsäure 20
      3 „ Kaliumbichromat . . . 80
      Eisessig 2

      Die Objekte bleiben (auf Fliesspapier) 48^h im Dunkeln in diesem Gemisch. Dann Wasser. Dann

1) Arch. Anat. Physiol. Abtlg. 1883.

entweder roher Holzessig für 24 h oder die Tannin-Pyrogallussäurereduktion nach Kolossow. Weiter Auswaschen in fliessendem Wasser 1—2 h, Alkohol, Paraffin. Färbung der Schnitte nach Heidenhain-Krause.

4. Pikrokarmin - Osmiumsäure nach Poljakoff. Fixation in dieser Mischung, die auch vorher intravaskulär injiziert werden kann, im Dunkeln für 36 bis 100 Std. Dann wird so lange in Wasser abgespült, bis kein Farbstoff mehr abgegeben wird. Nun Reduktion in der Tannin - Pyrogallussäuremischung von Kolossow 24—72 h. Auswaschen in fliessendem Wasser 1—2 h. Steigender Alkohol, vorsichtige Paraffineinbettung durch mehrere Alkohol-Xylol- und Xylol-Paraffinmischungen.
5. Müller'sche Lösung. Danach Paraffineinbettung und Färbung mit Safranin-Anilinblau nach Ciaglinski[1]) oder Garbini[2]); ferner mit Hämatoxylin-Eosin nach S. Gage.[3])

b) Untersuchung der Pulpa

Untersuchung der Pulpa (nach Hoehl). Diese Methode kann am frischen oder fixierten Objekt vorgenommen werden. Die Stücke sollen klein sein und sich während der einzelnen Manipulationen auf Fliesspapier befinden. Sie kommen

a) in eine reichliche Menge gesättigter wässriger Kaliumbichromatlösung im Thermostaten für 72 Std.,
b) in Aq. dest. zum Abspülen,
c) in 0,5proz. Eisen-Ammonium-Alaun für 72 Std.,
d) in Aq. dest. zum Abspülen,
e) in die Mischung von Kolossow (Tannin-Pyrogallussäure) auf 3 Tage,
f) in fliessendes Wasser 1—2 Std., Alkohol, Paraffin.

c) Untersuchung des Schmelzes

Untersuchung des Schmelzes. Nach Angaben von Graf Ferdinand Spee färbt sich der junge Schmelz in dem Gemisch

[1]) Vergl. Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. 8, 1891, p. 19.

[2]) Böhm-Oppel, Taschenbuch, III. Aufl. 1896, p. 75, oder Zool. Anz., Jahrg. 9.

[3]) Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. X, p. 103.

von Chromsäure und Osmiumsäure (siehe oben) dunkelbraun bis schwarz. Bei nachträglicher Färbung mit Hämatoxylin wird die Färbung noch intensiver durch Bildung eines Lackes. Alle übrigen Teile sind blau.

d) Untersuchung des Dentins

Untersuchung des Dentins. Zur Färbung dienen Bleu de Lyon und besonders Indigkarmin. Beide in den Lösungen, wie sie zur Färbung von Ossifikationspräparaten angewandt werden (siehe S. 214). Auch Orange G. kann zur Färbung gebraucht werden.

7. Gefässsystem und Blut

Gefässsystem und Blut. Die Entwickelung des Gefässsystems kann auf zwei Weisen untersucht werden:

1. Durch Rekonstruktion der Gefässstämme aus den einzelnen Schnitten auf dem Wege der graphischen oder plastischen Rekonstruktion (siehe diese).
2. Durch Injektion der Gefässe.

a) Injektion embryonaler Gefässe

α) nach Wertheim

Wertheim geht bei der letzteren Methode (bei Hühner- und Forellenembryonen) in der Weise vor, dass er sich Glaskanülen anfertigt, die an dem einen Ende kapillar ausgezogen sind, an dem anderen einen $^1/_2$ m langen Gummischlauch tragen. Die kapillare Spitze wird abgebrochen, aber nicht abgestumpft. Die Injektionsmasse ist wässrige Lösung von Berlinerblau ohne Glyzerinzusatz, da dieses die Injektion erschwert. Bei kleineren Embryonen erfolgt der Einstich der Kanüle in den Sinus terminalis; grössere werden vom Dotter abgehoben, auf den Objektträger gelegt und vom Bulbus aortae oder den Dottersackgefässen aus injiziert. Die Injektion geschieht durch vorsichtiges Einblasen. Ist der Farbstoff in die Amnionhöhle getreten, dann muss man sie vor der Fixation öffnen und denselben entfernen. Nach der Fixation gelingt dies ohne Schädigung des Embryo nicht mehr.

β) nach Valenti u. d'Abundo

Valenti und d'Abundo injizieren eine $^1/_2$proz. wässrige Lösung von salpetersaurem Silber. Nach der Injektion bleiben die Objekte 20 Min. im Lichte stehen und werden dann im absoluten Alkohol fixiert. Flint macht die Injektion bei Schweineembryonen entweder vom Herzen aus, nach Abschneiden der Herzspitze und Einführen der Kanüle durch das linke Herz in die Aorta oder von den Umbilicalgefässen aus, Clark durch Einstechen einer Pravazspritze in die Leber.

γ) nach Flint

δ) nach Clark

Wissozky empfiehlt als den „geeignetsten Ort zur Erforschung der ersten Anlage und der Entwickelung des Blutes und der Gefässe bei den Embryonen des Kaninchens“ den schmalen „Streifen der Eihäute am Rande der Plazenta zwischen dieser und dem Sinus terminalis. Hier entwickeln sich die Gefässe verhältnismäfsig spät, so dass man die erste Anlage derselben noch an Embryonen beobachten kann, bei welchem bereits in der Allantois ein mehr oder weniger vollkommener Kreislauf besteht“.

b) Untersuchungsobjekt

Entnahme des Blutes aus den embryonalen Gefässen zur Untersuchung seiner Elemente:

c) Entnahme des Blutes

1. Aus den subkutanen Halsvenen.
2. Aus dem Herzen.
3. Aus dem Ei: nach Öffnen des Eies am stumpfen Pole wird die Schale abpräpariert. ohne die Schalenhaut zu verletzen; ein durch dieselbe schimmerndes Gefäss aus dem Gefässhof des Embryo wird angeschnitten und das Blut kann auf diese Weise durch eine Pipette oder zwei aneinander gehaltene Deckgläser aus der Wunde genommen werden, ohne mit Eiweiss und Dotter in Berührung zu kommen (Engel).

Fixation. Entweder

d) Fixation des Blutes

1. Durch Antrocknen an der Kupferplatte nach Ehrlich; hierbei setzt Jost das embryonale Blut auf der Kupferplatte für $^1/_2$ Stunde einer Temperatur von 135° aus; Engel einer solchen von 100° C. (Siedepunkt des Wassers), 139° C. (Siedepunkt des Xylols), 150° C. (Siedepunkt des Terpentinöls) für $^1/_2$—2 Stunden. Oder
2. Durch Luft trocken machen im Exsiccator; kurze Einwirkung von Ammoniakdämpfen, Eintauchen in folgende Fixierungsflüssigkeit: Konz. Sublimatlösung — 2 proz. Osmiumsäure aa; Abspülen erst in verdünnter Pyrogallussäure, dann in Aq. dest. (Nach Pappenheim für das embryonale Blut der Amphibien.) Ferner kann man nach demselben Forscher das Gemisch von Nikiforoff anwenden, dem man 2 Tropfen konz. käuflicher Formollösung zugesetzt hat (ebenfalls für Amphibienblut).
3. durch 2 proz. Osmiumsäure (Engel für Huhn).

4. Durch Alkohol abs.
5. Durch Alkoholäther aa.
6. Durch Formalindämpfe (Jost für Rind und Schaf).

e) Zählung der Elemente des Blutes

Zählung der Elemente des Blutes. Tschistowitsch und Piwowarow verdünnen das Blut von Kaninchenembryonen zur Zählung im Thoma-Zeiss'schen Apparate auf die 20fache Menge entweder mit $^1/_3$ proz. Essigsäure oder mit Hayem'scher Flüssigkeit.

f) Färbung der Blutpräparate

Färbung. Zur Färbung des Hämoglobins empfiehlt Pappenheim (für Amphibien):

1. Das Triacidgemisch von Ehrlich.
2. Dasjenige von Biondi-Heidenhain.
3. Die Mischung von Bergonzini.
4. Eine Farblösung, die folgendermafsen zusammengesetzt wurde: In ein Röhrchen füllt man „ein Mafs von der Grösse eines gestrichenen Ohrlöffels Orange G, wenige Körnchen Patent S. Rubin, ein gehäuftes Mafs Alaun. zwei gehäufte Mafs Acid. sulfanilic.; Aq. dest. Auffüllen bis $^3/_4$ des Glases, Glyzerin-Auffüllen bis zum Rest, Umschütteln und Umrühren mit einem in Essigsäureanhydrid getauchten Glasstab" (Pappenheim). Jost ausser dem Triacid: für Rind und Schaf noch Eosin-Methylenblau, Rubeosin-Methylenblau. Engel: Eosin-Hämatoxylin und Eosin-Methylenblau (Chenzinsky).
5. Methode von Foà. Nach Fixierung mit Osmiumsäure Methylenblau für 3—4 Minuten, dann 1 proz. Chromsäure für 5 Minuten.
6. Methode von Kultschitzky: Färbung mit Hämatoxilin, Rubin und Helianthin. Zur Färbung der Kerne eignet sich, abgesehen von den gewöhnlichen Kernfärbemitteln, das Verfahren von Spuler, nämlich die Anwendung von Eisenalauncochenille. Hierbei kann man bemerken, wie der Kern beim Übergang in den kernlosen Zustand der Blutkörperchen allmählich seine Färbbarkeit einbüsst (Spuler).

g) Fixierung und Färbung des Blutes auf Schnitten

Fixierung und Färbung des Blutes auf Schnitten. Ein gutes Fixierungsmittel ist das Chromsäure-Sublimat-Eisessig-

Formalingemisch, besonders für Vögel (siehe Seite 173). Andere Mittel sind:

1. Nach Foà: 100 ccm Müller'scher Flüssigkeit werden zum Sieden gebracht und darin 2 g Sublimat rasch gelöst. Nach dem Abkühlen Fixation bei 35—40° für 2 bis 12 Stunden. Danach Auswaschen in Wasser; Alkohol; Paraffineinbettung. [1])
2. Nach Smiechowski für Vögel: Entweder 2proz. Lösung von Kalium bichrom. für 3—15 Tage; man muss aber grosse Mengen davon nehmen; oder 3proz. wässrige Sublimatlösung für 15—25 Minuten.
3. Nach van der Stricht für Säugetiere die Hermann'sche Flüssigkeit.

8. Centralnervensystem

Centralnervensystem. Will man sich Demonstrationspräparate des Gehirns und Rückenmarks herstellen, so kann man, wenn das Material das Herausnehmen des Centralnervensystems überhaupt gestattet, abgesehen davon, dass man die Objekte in Alkohol aufhebt, folgendermafsen verfahren.

a) Demonstrationspräparate

Nach Blackburn fixiert man das Centralnervensystem mit Müller'scher Flüssigkeit und durchtränkt es später mit Hilfe von Terpentin mit Wachs; die so hergestellten Präparate zeigen die Formen des Gehirns und Rückenmarks gut und lassen sich trocken aufheben. Oder man modifiziert die ursprünglich von Fredericq angegebene Methode in der Weise von Schwalbe: Die frischen Gehirne werden nach Giacomini in Chlorzink (oder auch in Alkohol) gehärtet. Dann zieht man die Pia ab und legt die Schnitte an; die Objekte aus Chlorzink werden in Wasser abgespült; bei den Alkoholpräparaten ist das nicht nötig. Dann wendet man erst Alkohol, ferner Terpentin für 8 Tage an. Im Wärmeofen werden die Objekte darauf bei 60° C. für 5—8 Tage mit Paraffin von 45 bis 50° durchtränkt; ist das geschehen, dann lässt man das Paraffin abtropfen und erkalten. Flesch erzielt denselben Effekt dadurch, dass er die Gehirne für 4 Wochen in Alkohol bringt, dann sie 2 Wochen mit einer Mischung von Glyzerin-Alkohol aa, der auf 3000 ccm 1 g Sublimat zugefügt ist und 4 Wochen mit Glyzerin-

[1]) Färbung der Schnitte mit: Aq. dest. 100, Hämatoxylin (Boehmer) 25, 1 proz. wässr. Weingeistlösung von Safranin 20; Nachfärbung in alkoh. Pikrinsäure oder alkoh. Orangelösung.

Sublimat (3000 : 1) behandelt. Darauf trocknet er sie im Vakuum über Chlorkalcium und hebt sie trocken auf. v. Lenhossék endlich überzieht die beliebig gehärteten und in Alkohol aufbewahrten Gehirne mit einer mitteldicken Lösung von Celloidin in Alkoholäther. Darauf trocknen lassen an der Luft.

b) Fixation des embryonalen Central-nervensystems

Für die Herausnahme des embryonalen Centralnervensystems macht Gerota folgende Angaben. Man injiziere in das Gefässsystem eine 10—15 proz. Lösung von Formol in 85 proz. Alkohol und wähle dazu bei einem menschlichen Embryo des 2. und 4. Monats die Arteria oder Vena umb. Die Menge, die man braucht, beträgt bei einem Neugeborenen 500 g, bei einem Embryo von 3—4 Monaten 50—100 g. Es ist ferner zweckmäſsig, vor der Herausnahme des Centralnervensystems den Kopf oder den ganzen Körper für 24—48 Stunden in eine 5—10 proz. wässrige Formollösung zu legen. Man kann das Centralnervensystem dann entweder gleich in der beabsichtigten Weise mikroskopisch verarbeiten oder erst noch 15—20 Tage oder auch länger in der 5—10 proz. wässrigen Formollösung aufheben.

Gustav Retzius injiziert bei fötalen Gehirnen in die Nabenvene oder Aorta eine etwas modifizierte Chrom-Osmium-Essigsäure, für die Gehirne von Embryonen aus den ersten Monaten 3—4 proz. Kaliumbichromatlösung, für die Gehirne von Erwachsenen und Kindern 3—4 proz. Kaliumbichromatlösung mit Zusatz von 0,5 bis 1 $^0/_0$ Formol.

c) Embryonale Nervenfasern Marklose Nervenfasern

Embryonale Nervenfasern. Zur Untersuchung der Bildung und Verbreitung der marklosen Nervenfasern kommen als Färbemittel in Betracht:

1. Hämatoxylin. Seessel: Fixiert man Hühnerembryonen in Chromsäure und zwar in $^1/_3$ proz. Chromsäure 1 Tag, dann in $^1/_2$ proz. Chromsäure 4—5 Tage und färbt mit Hämatoxylin, so erhält man Bilder, auf denen man die Nervenfasern von ihrem ersten Auftreten an sehen kann.
2. Eosin, Erythrosin, Säurefuchsin nach voraufgegangener Kernfärbung mit Hämatoxylin.
3. Bleu de Lyon nach Kernfärbung mit Boraxkarmin. Es wird in wässriger Lösung angewandt.
4. Eisenhämatoxylin und Eosin. Die Nervenfasern werden dadurch intensiv rot gefärbt. Nach Godlewski wird

bei Material, das in Sublimat-Eisessig oder im Carnoy-Gemisch fixiert ist, diese Färbung ganz besonders schön, „wenn die Differenzierung in Eisenalaun nicht auf einmal geschieht, sondern wenn sie einige Male unterbrochen wird und in der Zwischenzeit die Präparate in Eosinlösung verweilen“.

Die Entstehung der marklosen Fasern kann man mit Vorteil, ausser am Centralnervensystem, noch untersuchen an dem Nervus lateralis junger Lophiuslarven oder an der Haut von Amphibienlarven von 2—3 Tagen, bei letzteren besonders an jener Hautpartie, aus der sich die embryonale Flosse bildet (Raffaele).

Markhaltige Nervenfasern nach Weigert-Pal nach Döllken

Markhaltige Nervenfasern. Die Methoden, die zur Darstellung der Entwickelung der Faserbahnen im Hirn und Rückenmark dienen, sind in erster Linie die Weigert'sche Markscheidenfärbung, sowohl in der Originalvorschrift wie in der Modifikation von Pal. Döllken gibt für die Weigert-Pal-Färbung sehr junger Gehirne, die mit 5—10 proz. Formaldehyd vorfixiert und gut gechromt sein müssen, an, dass es zweckmäfsig ist, die Schnitte in der Hämatoxylinlösung (Pal)[1]) 4 bis 5 Tage kalt und dann noch 2 Std. bei 37° C. zu färben. Dann kommen sie

1. in Brunnenwasser für 6—8 Std.;
2. in alkalisches destilliertes Wasser (2—3 Tropfen Kalilauge auf 1 Liter) für $^1/_4$ Std.;
3. in eine $^1/_2$ proz. Kaliumpermanganatlösung. „bis die marklosen Stellen beginnen durchzuscheinen“;
4. in destilliertes Wasser zum Auswaschen;
5. in 1 proz. Oxalsäurelösung, „bis die marklosen Stellen hellbraun, Rinde und Kerne aber noch dunkler aussehen“;
6. in viel Aq. dest. Die Objekte müssen, wie gesagt, mit Formaldehyd vor- und mit Chrom nachbehandelt sein. Die Vorfixierung muss für ein Kindergehirn 3 bis 4 Wochen, die Chromierung 5 bis 7 Monate dauern. (Döllken).

nach Gerota

Gerota geht bei der Weigert-Pal-Färbung so vor, dass er die mit der 5—10 proz. Formalinlösung behandelten Objekte

1. einige Std. in Wasser auswäscht, sie dann

[1]) Siehe Seite 136.

2. für 2—4 Tage in eine 4—7proz. Kaliumbichromatlösung bei 38° C. bringt. Dann Alkohol, Celloidineinbettung.

Die Schnitte kommen dann in folgende Lösung:

6,0 g Hämatoxylin werden in 60,0 ccm abs. Alkohol gelöst und dazu 200 g einer 1proz. Alaunlösung gefügt. Diese Mischung bleibt leicht zugedeckt 10 Tage am Licht stehen. Man färbt die Schnitte hiermit 24 h in der Wärme (37° C.), bringt sie für 2 h in die Kupferacetatlösung und differenziert dann mit der Weigert-schen Differenzierungsflüssigkeit.

nach Plessen-Rabinovics (Salamander)

Plessen und Rabinovics fixieren zur Untersuchung der Kopfnerven junger Salamanderlarven diese, die eine Länge von 2,5 bis 3,0 ccm hatten, in Müller'scher Flüssigkeit für 8 Tage. Die Paraffinschnitte kommen darauf zur Beizung in die Erlicki'sche Flüssigkeit:

Kal. bichromicum	2,5
Cuprum sulfuricum	0,5
Aq. dest.	100,0

für 1 bis 2 Std. bei 50° C. Sie werden dann in Wasser gründlich ausgewaschen und bei 50° C. für eine bis 2 h gefärbt in

Hämatoxylin	1,0 g
Abs. Alkohol	5,0 „
Aq. dest.	200,0 „
Eisessig	2,0 „

Wiederum Auswaschen und differenzieren in

Lithion carb. conc.	50 cm
1proz. rotes Blutlaugensalz . . .	50 „

nach Lachi (Huhn)

Für Vögel gibt Lachi an, dass die Färbung nach Weigert nur bei Embryonen (Huhn) glückte, die älter als 18 Tage waren.

Embryonale Nervenzellen

Embryonale Nervenzellen. Zur Untersuchung der embryonalen Nervenzellen sind verwandt worden

I. die schnelle Golgi-Ramon y Cajal'sche Methode,

II. all die Methoden, die dazu dienen, die sog. Nissl-Schollen der Ganglienzellen sichtbar zu machen.

I. nach Ramon y Cajal

I. Anwendung der „schnellen“ Golgi-Ramon y Cajal'schen Methode.

Dabei kommen, wie bekannt, nacheinander folgende zwei Lösungen zur Verwendung:

1. eine Osmium-Kaliumbichromatmischung.
2. eine Lösung von Argentum nitricum.

Im einzelnen gestalten sich die Verfahren folgendermaſsen:

a) Amphibien

a) Amphibien. Die Imprägnation gelingt nach Athias bei den Kaulquappen am besten bei Larven von 2—3,5 cm Länge. Je jünger sie sind, desto schwieriger ist sie; man muss dann doppelt und dreifach imprägnieren. Eine einfache Imprägnation genügt bei ausgewachsenen Larven, eine dreifache muss angewandt werden bei solchen von 1 cm Länge. Die Osmiumbichromatmischung hat die folgende Zusammensetzung:

1 proz. Osmiumsäure 1
3 proz. Kaliumbichromat . . . . 4.

Die in 2, 3 oder 4 Stücke zerschnittenen Larven kommen auf 1—5 Tage in diese Mischung, wobei man auf je 1 Stück 10—15 ccm verwendet, die jüngeren auf 2—3, die älteren auf 4—5 Tage. Dann schnelles Abspülen in Aq. dest. und Abtrocknen mit Fliesspapier; darauf für 1—2 Tage in die Silberlösung, der man auf 100 ccm einen Tropfen Ameisensäure zusetzen kann. Für die doppelte Imprägnation benutzt man die schon gebrauchte Osmiumbichromatlösung, nachdem man ihr auf je 25 ccm 1 g Kaliumbichromat zugefügt hat.

b) Fische

b) Fische. van Gehuchten empfiehlt als günstiges Untersuchungsobjekt Forellenembryonen von 45—50 Tagen und Forellen von 1—25 Tagen. Auch hier ist eine dreifache Imprägnation nötig. Der Aufenthalt der in Stücke geschnittenen Tiere in der Osmiumbichromatmischung beträgt 3 Tage.

c) Vögel

c) Vögel. Ramon y Cajal hat Hühnerembryonen von 6 bis 14 Tagen untersucht. Er lässt die Stücke 20, 24 und 30^h in einer Mischung von 20 Teilen einer 3 proz. Kaliumbichromatlösung und 5 Teilen einer 1 proz. Osmiumsäure. In der Argentum nitricum-Lösung bleiben sie 24^h. Disse imprägniert Gänseembryonen (6 bis

15 Tage), Entenembryonen (5—8 Tage), Hühnerembryonen (3—8 Tage); er bringt sie aus dem Ei in

3 proz. Lösung von Kaliumbichromat . . 4
1 proz. Osmiumsäure 1

für 3 Tage. Nach 24^h Erneuern der Flüssigkeit. Darauf Abspülen in Wasser, dann 3 tägiger Aufenthalt in 0,75 proz. Silberlösung, die nach 24^h erneuert wird. Diese ganze Behandlung wird 2—3 mal wiederholt. Dann für 24^h in abs. Alkohol; ebenso lange in Collodium duplex. Dieses wird durch Hineinwerfen von Celloidinstücken rasch verdickt. Reduktion der Schnitte nach Kallius (Anat. H., H. 5).

d) Säugetiere

d) Säugetiere. Gise brachte die Stücke des Centralnervensystems menschlicher Embryonen vom 3. bis 10. Monat für 3 bis 4 Tage in

3 proz. Kaliumbichromatlösung 4
1 proz. Osmiumsäure 1,

dann kamen sie nach Abspülung in schon gebrauchter Silberlösung auf 2 Tage in die 0,75 proz. Lösung von Arg. nitric. Stefanowska imprägniert die Rindenzellen junger Mäuse in der Weise, dass sie die Stückchen des Materials in Gelatine einschliesst und so mit der Osmiumbichromatmischung und der Silberlösung behandelt. Der Aufenthalt in ersterem Gemisch beträgt 9—12 Tage, in dem letzteren 6—9 Tage. Man muss doppelt und dreifach imprägnieren. erhält aber bis zum 8. Tage inkonstante, erst von da an konstante Resultate.

II. nach anderen Methoden

Andere Färbemethoden embryonaler Nervenzellen sind: Hämatoxylin-Erythrosin, Kresylviolett RR in der Lösung von 0,5 auf 200 ccm Aq. dest., Magentharot (Nissl), Methylenblau (Nissl). Thionin, Toluidin. Sehr zweckmäfsig ist es, die Objekte (besonders Vogelembryonen) mit Zenker'scher Flüssigkeit zu fixieren. Scott empfiehlt zur Fixierung Pikrinsublimat oder ganz besonders

Sublimat in 95 proz. Alkohol gesättigt,
2 proz. wässrige Kaliumbichromatlösung aa.

Die Färbung nimmt er in der Weise vor, dass er die Schnitte erst in wässriger Toluidin- oder Methylenblaulösung färbt, dann in einer Mischung von Anilinöl und Alkohol differenziert. Ferner wandte er Toluidinblau-Eosin, Methylenblau-Erythrosin, Flemming'sche Orangemethode, Safranin-Lichtgrün nach Benda, die Mischung nach Ehrlich-Biondi an.

Literatur zu Kapitel 12

Boll, Arch. mikr. Anat. Bd. 8. 1872. — Breslauer. Arch. mikr. Anat. Bd. 5, 1869. — Flemming, Arch. Anat. Entwickelungsgesch. 1897; Festschr. f. Virchow, Bd. 1, 1891. — Waldeyer, Sitz.-Ber. akad. Wiss., Berlin 1895. — Czermak, Anat. Anz. Bd. 3, 1888. — Zachariadès, Compt. rend. Soc. Paris T. 126, 1898. — Ognew, Arch. Anat. Physiol. Anat. Abtlg. 1885. — Spuler, Anat. Hefte VII, 1897. — Merkel, Verh. anat. Gesellsch., Bd. 1895. — Hansen, Anat. Anz. Bd. 15, 1898.

O. Hertwig, Arch mikr. Anat. Bd. 9, 1873. — Kuskow, Arch. mikr. Anat., Bd. 30. — Teuffel, Arch. Anat. Entwickelungsgesch. 1902, H. V/VI. Gardner, zit. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 18; Biol. Zentralbl. Bd. 17, 1897. — Babor, Verh. V. intern. Zoologenkongress 1901, Berlin.

Kaestner, Zeitschr. Anat. Entwickelungsgesch. 1893. — Weiss, Journ. Physiol. et Patholog. gén. 1899. — Regnauld, Journ. l'Anat. Physiol. T. 28 1892. — Motta-Coco, ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., Bd. 18. — Godlewski, Arch. mikr. Anat. Bd. 60, 1902. — Marceau, Bibl. anat. Bd. 10, 1902. — Mac Callum, Anat. Anz. Bd. 13, 1897. — Calberla, Arch. mikr. Anat. Bd. 11.

Retterer. Journ. l'Anat. et de la Physiol. T. 36. 1900. — Klaatsch, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 4. — Merkel-Bayerl, vergl. Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 1, 1884, p. 289. — O. Schultze, Anhang z. Grundriss der Entwickelungsgesch. d. Menschen u. der Säugetiere. Leipzig 1897. — Haug, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 8. — Stowell, ref. nach Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 1, p. 575. — Schaffer, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 19. — Thoma, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 8. — Schönemann, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 19. — L. Bakay, Anat. Anz., Ergänzungsh. 21, p. 248.

Graf Spee, Anat. Anz. Bd. 2. — Hoehl. Arch. Anat. Physiol., anat. Abtlg., 1896.

Wertheim, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 9. — Valenti-d'Abundo, ref. Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. 8. — Flint, ref. Zeitschr. wiss Mikrosk. Bd. 18. — Wissozky, Arch. mikr. Anat. Bd. 13. — Engel, Arch. Anat. Physiol., phys. Abtlg., 1894; Arch. mikr. Anat. Bd. 54, 42, 44. — Jost, Arch. mikr. Anat. Bd. 61. — Tschistowitsch-Piwowarow, Arch. mikr. Anat. Bd. 57. — Pappenheim, Virchow's Archiv 145, 1896. — Spuler, Encyklopädie Bd. 1, p. 154. — Foà, Festschr. Virchow Bd. 1, 1891. — Smiechowski, Diss. Dorpat 1892. — van der Stricht, Anat. Anz. Bd. 6.

Blackburn, ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 5. — Schwalbe, Anat. Anz. Bd. 1. — Flesch, Anat. Anz. Bd. 2. — v. Lenhossék, Anat. Anz. Bd. 2. — Gerota, Intern. Monatsschr. Anat. Physiol. Bd. 13. — G. Retzius,

Das Menschenhirn, Stockholm 1896. — Seessel, Arch. Anat. Physiol., anat. Abtlg., 1877. — Godlewski, Arch. mikr. Anat. Bd. 60. — Doellken. Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 15. — Plessen-Rabinovicz, ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 8. — Lachi, ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 8. — Athias, Bibl. anat. T. 5. — van Gehuchten, La cellule T. 11. — Ramon y Cajal, Anat. Anz. Bd. 5.[1]) — Disse, Anat. Hefte 1897. — Gise, ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 16. — Stefanowska, ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 16. — Scott, ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 17.

Kapitel 13

Die Bildung des Myelins und der Schwann'schen Scheide, die Entstehung des Glykogens und die Methoden von Hochstetter zur Darstellung der Hohlgangssysteme des embryonalen Körpers

Myelin

Zur Frage nach der **Herkunft des Myelins** macht R. Wlassak die folgenden technischen Angaben. Drei Stoffe sind es, die im Myelin vorkommen und die man auf mikrochemischem Wege nachweisen kann: Protagon, Fett, Lecithin. Das Protagon wird dargestellt durch die Weigert'sche Markscheidenfärbung, sowohl nach langdauernder Beizung mit 5proz. Kaliumbichromat als auch nach Anwendung der neuen Weigert'schen Beize (Kal. bichrom. 5 g, Chromalaun 2 g in 100 ccm Wasser). Als Differenzierungsflüssigkeit dient die Borax-Ferricyankaliumlösung. Fett und Lecithin macht Osmiumsäure, Lecithin allein die Marchi'sche Methode deutlich. Die Osmiumsäure muss dabei in dem Altmann'schen Gemisch in Anwendung kommen (2proz. Osmiumsäure und 5proz. Kalium bichrom. aa), bei der Methode von Marchi werden die Objekte erst mit $3^1/_2$proz. Kal. bichrom., dann mit einer Mischung von 1proz. Osmiumsäure 1 Teil, $2^1/_2$proz. Kal. bichrom. 2 Teile behandelt. Die Osmiumsäure muss gut ausgewaschen, der Übergang von Alkohol zum Paraffin mit Hülfe von Petroleumäther bewerkstelligt werden.

[1]) Cit. n. Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. 7 p. 235.

Ambronn und Held bedienen sich der sogenannten optischen Methode, d. h. des Polarisationsmikroskopes, um die Herkunft des Myelins zu untersuchen.

Für das Studium der Bildung der Schwann'schen Scheide empfiehlt Gurwitsch bei Schafembryonen für die allerersten Stadien das Apáthy'sche Vergoldungsverfahren, für die späteren Stadien die Eisenhämatoxylinmethode (Heidenhain).

Glykogen

Die **Entstehung des Glykogens** untersucht man am besten mit Hülfe der Jodgummimethode von Ehrlich. Ich verweise in Betreff der interessanten Einzelheiten, die man bei dem Glykogengehalt embryonaler Organe bemerkt, auf die unter Ehrlich's Leitung angefertigte schöne Dissertation von Otto Meyer (Über den Glykogengehalt embryonaler und jugendlicher Organe. Diss. Breslau 1884).

Darstellung embryonaler Hohlräume

Darstellung der Hohlräume des embryonalen Körpers. Um die Hohlräume des embryonalen Körpers, ihre Form und Ausdehnung darzustellen, kann man sich der graphischen und der plastischen Rekonstruktion bedienen und zwar von der letzteren ausser dem Verfahren von Born-Strasser der Methode von Selenka. Doch auch die Injektion kann, wie bei dem Gefässsystem (siehe dieses) in Anwendung kommen. Ein sehr sinnreiches Injektionsverfahren hat Hochstetter angegeben. Er hat dasselbe speziell an dem Hohlraumsystem der Lunge und des Ohres erprobt.

Die Gehörorgane sind in Nelkenöl aufgehellt; sie kommen dann in eine Mischung von Nelkenöl 1 und Chloroform 2. Wenn diese die Präparate durchtränkt hat, nimmt man die Objekte heraus und lässt sie 4 bis 5 Min. an der Luft liegen. Das Chloroform verdunstet, die Präparate werden weiss. In den Hohlräumen des Ohres bildet sich Chloroformgas, das sie erfüllt. Bringt man nun die Objekte in reines Nelkenöl, so bleibt dieses Chloroformgas gefangen und stellt an den sonst durchsichtigen Objekten einen Ausguss der Hohlräume dar.

Bei Objekten, deren Hohlraumsystem mit der Aussenwelt kommuniziert, wie die Lunge durch den Durchschnitt der Trachea, kann man die Hohlräume mit Berlinerblau oder chinesischer Tusche füllen, indem man z. B. die Öffnung der Trachea durch ein in sie gestecktes Kapillarrohr an die zu injizierende Flüssigkeit hält, während das Chloroform aus der Chloroform-Nelkenölmischung ver-

dunstet. In demselben Mafse, wie das Chloroform verdunstet, wird dann Berlinerblau oder chinesische Tusche in die Trachea, Bronchien und Alveolen gesogen. Bringt man nun die Objekte in reines Nelkenöl, so sieht man an den durchsichtigen Präparaten den Ausguss des Bronchialbaumes.

Literatur zu Kapitel 13

R Wlassak, Arch. Entwickelungsgesch. Bd. 6. — Ambronn u. Held, Zeitschr. Anat. Entwickelungsgesch. 1896. — Gurwitsch, Arch. Anat. Physiol.. anat. Abtlg., 1900. — Otto Meyor, Dissert. Breslau 1884. — Hochstetter, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 15.

Kapitel 14

Experimentelle Entwickelungsgeschichte

Das Gebiet der experimentellen Entwickelungsgeschichte hat in letzter Zeit zwei ausführliche Bearbeitungen gefunden, einmal in der im Verlage von J. F. Bergmann (Wiesbaden) erschienenen „Einführung in die experimentelle Entwickelungsgeschichte“ von O. Maass, dann in dem entsprechenden Abschnitt in der Encyclopädie der mikroskopischen Technik. Ich werde mich daher hier nur auf die Hauptsachen beschränken und lediglich die angewandten Methoden kurz zusammenstellen. Die experimentelle Entwickelungsgeschichte untersucht den Verlauf der Entwickelung in künstlich gesetzten Verhältnissen. Man kann die Einflüsse, die man auf die werdenden Organismen hat einwirken lassen, im grossen und ganzen scheiden in solcher mechanischer, thermischer, chemischer und elektrischer Natur, wozu dann noch die Reize kommen, die verschiedenfarbiges Licht ausübt.

Pflüger'sche Zwangslage

Über die sogenannte Pflüger'sche Zwangslage. Batrachiereier haben die Eigenschaft, im unbefruchteten Zustande eine solche Lage im Wasser einzunehmen, dass ihre Achse jeden beliebigen

Winkel mit der Richtung der Schwerkraft macht (Pflüger). Sind sie dagegen befruchtet, so drehen sie sich kurze Zeit nach der Besamung so, dass ihr pigmentierter Pol genau nach oben, ihr unpigmentierter genau nach unten sieht. Man kann aber auch befruchtete Eier in jeder beliebigen Stellung ihrer Achse festhalten, wenn man das folgende Verfahren anwendet. Pflüger sagt darüber: „Das soeben die Gebärmutter des weiblichen Frosches verlassende Ei hat eine dünne Schleimhülle, welche mit Begierde Wasser ansaugt, sobald das Ei in dasselbe gelangt Dabei schwillt die Schleimhülle ungeheuer auf und um das Ei bildet sich eine mit Flüssigkeit gefüllte Höhle, in welcher dasselbe leicht rotieren kann. Wenn man nun die trocknen Eier dem Uterus brünstiger Weibchen entnimmt, sie auf ein trockenes Uhrglas legt und einige Tropfen besamtes Wasser hinzugibt, oder wenn man erst ein wenig besamtes Wasser in ein Uhrglas bringt und dann die Eier hineinfallen lässt, aber nach einigen Sekunden alle Flüssigkeit abgiesst, so kleben dieselben an dem Uhrglas mit ihrer Gallerthülle ganz fest, sodass sie auch beim Umkehren des Glases haften bleiben. Auf diese Weise hatten sie nicht Zeit, so viel Wasser anzusaugen, dass innerhalb der Gallerthülle ein mit Flüssigkeit gefüllter Raum von hinreichender Dimension für die freie Bewegung des Eies sich entwickeln kann. Die Eier werden gleichwohl befruchtet, können sich aber nicht mehr drehen.“ Sie befinden sich somit in einer Zwangslage, die ihrer weiteren Entwickelung zwar nicht hinderlich ist, ihnen aber nicht gestattet sich in der Richtung der Schwerkraft einzustellen. Nach O. Schultze führt man die Zwangslage am besten dadurch herbei, dass man auf die auf eine Platte reihenweise gesetzten Eier kurze Zeit einen feinen Sprühregen fallen lässt, sie dann in samenhaltiges Wasser zur Befruchtung und schliesslich zur Weiterentwickelung in eine feuchte Kammer bringt.

Platten-zwangslage

Über die sogenannte Plattenzwangslage (Born). Auf andere Weise wird nach Pflüger, Roux, Born, O. Hertwig, O. Schultze eine Zwangslage herbeigeführt, wenn man die Eier zwischen zwei parallelen Glasscheiben einschliesst, die durch verschieden dicke Glasstreifen auseinander und durch umgelegte Gummiringe zusammengehalten werden; der Plattenabstand soll nach Born und O. Schultze 1,65—1,35 mm betragen. Wenn der Zwischenraum zwischen den beiden Platten kleiner gewählt wird, als der Eidurchmesser beträgt,



so werden die Eier mehr oder weniger stark komprimiert. Wird die Kompression nicht übertrieben weit ausgedehnt, so furchen sich die Eier trotz ihrer abgeänderten Gestalt weiter. Je nach der Lage und Stellung, die man den Platten mit den Eiern gibt, kann die Einwirkung der Schwerkraft in aller verschiedenster Weise umgestaltet oder ganz aufgehoben werden.[1]) Dasselbe geschieht durch **Einziehen der Eier in enge Röhrchen** (O. Hertwig, Roux) und Aufstellen derselben in bestimmter Weise. Eine Aufhebung der Schwerkraftswirkung lässt sich ferner durch Benutzung der **Centrifugalkraft** erreichen. Rauber gebraucht dazu bei Forelleneiern das Althaus'sche Reaktionsrad, O. Hertwig bei Rana esc. und fusca einen besonders konstruierten Rotationsapparat. Ueber denselben sagt er: „Ein schweres, eisernes Stativ trug einen starken, U-förmig gebogenen, eisernen Rahmen, der vertikal, mit der Öffnung zur Seite, befestigt war. Zwischen den offenen Enden des Rahmens war eine Stahlspindel angebracht, die in 2 scharfe Spitzen auslief und mit diesen in 2 konische Gruben eingriff, so dass sie leicht um ihre Achse rotiert werden konnte. An ihrem oberen Ende war ein Satz von kleineren und grösseren Holzscheiben befestigt, mit welchen eine Seidenschnur als Transmission in Verbindung gesetzt wurde, um dadurch die Bewegung eines Motors auf den Apparat zu übertragen. Von der Mitte der vertikalen Stahlspindel gingen in horizontaler Richtung 4 starke Eisenstäbe von 40 cm Länge aus, zusammen ein Kreuz bildend. An einem jeden von ihnen waren mit Schrauben, in einigen Versuchen vier, in anderen drei Messingkapseln in verschiedenen Abständen befestigt, welche dazu bestimmt waren, die Glasröhrchen mit den Versuchseiern aufzunehmen. Bei der Anordnung zu dreien betrug der Abstand von der Umdrehungsachse 40 cm, 29 cm, 18 cm.

Einziehen in enge Röhrchen

Centrifugieren

„Um den Centrifugalapparat in Bewegung zu setzen, bediente ich mich im ersten Jahre der Wasserkraft. Von einem Freibassin, das auf dem Boden des Instituts angebracht war, wurde durch eine Rohrleitung ein Wasserstrahl in eine kleine Turbine geleitet, deren Umdrehungsgeschwindigkeit durch die oben erwähnte Transmission auf die Holzscheiben des Centrifugalapparates übertragen wurde. Da

[1]) So hat z. B. O. Hertwig in einer unlängst erschienenen Arbeit (Festschrift f. Haeckel, Jen. Denkschriften XI, Jena 1904) die zwischen zwei Platten komprimierten Eier in einem Winkel von 45° zur Horizontalebene aufgestellt.

indessen der Wasserdruck zur raschen Bewegung des Apparates, den ich im zweiten Jahre kräftiger bauen liess, um Erschütterungen zu beseitigen, nicht genügend stark war, so benutzte ich später als Motor eine kleine Dynamomaschine von Schuckert, welche ich in die elektrische Leitung des Institutes einschalt. Durch Variierung eingeschalteter Widerstände liess sich die Umdrehungsgeschwindigkeit des Centrifugalapparates auf das Genaueste regulieren und Tage lang nahezu konstant erhalten." [1])

Statt des Rotationsapparates verwendet Kathariner einen starken Luftstrom, der durch das Wasser, in dem der Laich von Rana fusca liegt, geleitet wird. Er treibt den Laich in einer bestimmten Kreisbewegung herum, wobei die Eier gerüttelt und geschüttelt werden und jeden Moment eine andere Stellung zur Richtung der Schwerkraft haben.

Weitere Lageveränderungen bei anderen Objekten

Die Veränderung der Lage, die in diesen Versuchsanordnungen teils allein teils im Verein mit einer mehr oder weniger hohen Gestaltsveränderung den Entwickelungsgang in anormaler Weise beeinflusste, übte auch noch in anderen Versuchen und bei anderen Objekten einen Reiz im Sinne der experimentellen Embryologie aus. So drehte z. B. Morgan Froscheier, die nach der Roux'schen Vorschrift angestochen waren so, dass der weisse Pol nach oben sah; in diesem Falle hinderte das durch die Operation hervorgerufene Extraovat die Rückkehr des Eies in die alte Lage; und Henking kehrte das Erlenblatt, das auf seiner Unterseite die Eier von Agelastika trug um. Vermöge des klebrigen Drüsensekretes auf der Schalenoberfläche sind nämlich nach ihm die Eier so an der Unterseite des Blattes befestigt, dass der Pol, der die Samenfäden enthält nach abwärts gerichtet ist. Dreht man das Blatt um, so wirkt nun die Schwerkraft in ganz anderer Weise ein. Vorausgesetzt wird dabei allerdings, dass die klebrige Hülle die Eier unabänderlich festhält.

Strahl fixierte bei Vögeleier den Dotter durch Einstechen von Nadeln und lagerte den Keim während der Bebrütung nach unten. Er erhielt dadurch einen Situs inversus der vorderen Körperhälfte und eine Umkehrung der Herzschleife. v. Baer und Gerlach machten die Beobachtung, dass alle Hühnereier, die während der

[1]) Neuerdings (Arch. mikr. Anat. Bd. 63 1904) gebraucht O. Hertwig einen von Leppin und Masche (Berlin) hergestellten Motor, der elektrisch betrieben wird und bei dem die Umdrehungszahlen genau bestimmt werden können.



Bebrütung nicht horizontal liegen, sondern vertikal stehen, ausnahmslos absterben.

Erschütterung

Erschütterung. Féré schüttelte Hühnereier vor der Bebrütung, bekam dadurch aber keine Missbildung. Driesch schüttelt die Eier von Sphärechinus gran. und Echinus mikrotub. 3 Minuten nach Zusatz des Samens kräftig durch, um ein Platzen der Dottermembran zu erzielen und membranlose Eier zu erhalten. Boveri bringt nach dem Vorgang von O. und R. Hertwig unbefruchtete Eier von Echinus mikrotub. durch Schütteln zum Zerfall und befruchtet die Fragmente.

Anstich-, Zerschneidungs- und Durchschnürungsversuche.

Anstechen

Anstechen mit einer heissen Nadel. Roux gebraucht zu dieser Operation eine mit einer Kugel als Wärmeträger versehene Nadel. Die Dicke der Kugel ist 7 mm, ihre Entfernung von der Nadelspitze 12 mm. Die Nadel wird in der Flamme desinfiziert und erwärmt. Nun Einstechen in die eine Furchungskugel parallel der ersten Furche in der Richtung auf den oberhalb der Mitte liegende Furchungskern. Zwischen den einzelnen Operationen wird die Nadel auf einem bereitliegenden Schleifstein geschliffen und von neuem erwärmt. Zum Anstechen dient ferner bei kleinen Eiern der Apparat von Chabry-Kopsch. Siehe über ihn Seite 71.

Anstechen mit kapillar ausgezogenen Röhrchen, die mit reizenden Substanzen gefüllt sind. K. Ziegler bei Rana fusca; die Röhrchen waren mit $^1/_5$ proz. Eukalyptol oder mit Chininlösung gefüllt.

Anbrennen

Anbrennen mit Hülfe eines durch den elektrischen Strom glühend gemachten Instrumentes. Kopsch zur Anbringung von Marken und Herbeiführung von Defekten an den Keimscheiben von Huhn, Scyllium und der Forelle.[1]) Desgl. Spemann bei den Eiern von Rana fusca. Der leztere hat zum Fassen der Eier bei den Operationen eine praktische kleine Pinzette mit kleinen Haltnäpfen und einer Stellschraube konstruiert. Sie ist bei G. Stoeber in Würzburg zu haben.

Zerschneiden

Zerschneidung. Haeckel zerschnitt Morulae und Blastulae der Siphonophoren mit einer scharfen Nadel in 1, 3 und 4 Stücke

---

[1]) Eine ganz genaue Beschreibung seiner exakten Operationsmethode giebt Kopsch in seinem kürzlich erschienenen Buche („Gastrulation und Embryobildung bei den Chordaten" Leipzig 1904) auf Seite 40—43.

und erhielt ebensoviel vollständige Larven. Roux zerteilte Froscheier, die sich auf dem Morulastadium befanden, mit Hülfe von Nadeln oder einer Schere, um den Cytotropismus der Furchungszellen kennen zu lernen. Als Medium gebrauchte er unzerschnittenes durch Watte filtriertes frisches Hühnereiweiss oder 0,5 proz. Kochsalzlösung oder eine Mischung beider. Man darf nur Eier aus dem Anfang der Laichperiode nehmen und muss sich vor im Medium auftretenden Strömungen hüten. Um solche im Hühnereiweiss zu erkennen, wurde zu demselben feiner Gummi-Traganthschleim gesetzt. Driesch zerschnitt die Eier von Phallusia mamm., Driesch und Morgan diejenigen von Beroe ovata. Ebenfalls bei Beroe ovata experimentierte Fischel, indem er versuchte die Furchungszellen innerhalb der unverletzten Eihülle zu isolieren, wozu er sich des Druckes mit einer Pinzette oder mit dem Rücken des sogenannten Knapp'schen Messers bediente Schaper entfernte bei Larven von Rana esc. Stücke des Centralnervensystems durch Abschneiden oder Abbrennen.

Zerschnüren

Zerschnürung. Mit einem Haar zerschnürten O. Hertwig, v. Ebner, Endres, Herlitzka und Spemann gefurchte Eier vom Triton in verschiedenen Richtungen, Endres verband die Anbrennungsmethode mit der Durchschnürung, „indem er erst einschnürte und dann die Brücke zwischen den Furchungszellen durchbrannte,“ Herlitzka konstruierte einen besonderen Apparat, um das Durchschnüren zu ermöglichen. Spemann gibt folgende technische Winke: Man entfernt die äussere Klebschicht, wobei oft die elastische Eikapsel ebenfalls entfernt wird. Zur Durchschnürung dienen dünne und gleichmässige Haare, am besten Kinderhaare. Man macht die doppelte Schlinge und schiebt in sie mit der Pinzette das Ei hinein. Oder man drängt das Ei durch die Umschnürung in eine Ecke der Kapsel und macht in dieser einen Einschnitt, durch den dann ein Teil des Eies hinaustritt. Hier wirkt die Kapsel als Schnürmittel; um das Ei in der Hülle zu durchschnüren, zieht man ein Haar in eine ganz feine nur für ein Haar durchgängige Kapillare und durchsticht hiermit die Eikapsel, sodass hierdurch das Haar in das Innere der Kapsel kommt. Um spätere Stadien zu durchschnüren, schnürt man das Ei im Zweizellenstadium oder als Blastula nur ein wenig ein und verstärkt dann die Ligatur erst in dem gewünschten Stadium.

Kälte und Wärme

Einwirkung von Kälte und Wärme. In den folgenden Rubriken sind immer nur einige wenige Arbeiten erwähnt, denn die Versuchs-

bedingungen sind einmal so einfach, andererseits so ungeheuer variabel, dass eine detaillierte Aufzählung ins Endlose führen würde.

1. Echinodermen

Echinodermen. O. Hertwig brachte die Eier in ein Gemenge von Eisstückchen und Kochsalz. Dadurch wurde eine Temperatur von —2° bis —3° erzielt. Die Eier befanden sich in Röhrchen und wurden, wenn sie noch unbefruchtet waren, auf 15, 30, 60, 105, 120 Minuten in die Kältemischung gebracht und dann befruchtet; war die Befruchtung an ihnen schon erfolgt, so kamen sie 5 Minuten darauf für $1^1/_2$ Stunden in das Eisgemisch. An den Eiern der Echiniden experimentierte Driesch.

2. Vermes

Vermes. L. Sala setzte die lebenden Pferdespulwürmer verschiedenen Temperaturen aus, die $^1/_2$ — 2 Stunden einwirkten. Sie lagen zwischen + 3° und — 5° C., darauf wurden die Würmer langsam auf Zimmertemperatur erwärmt und dann 1—2 Tage bei 28—30° C. gehalten.

3. Arthropoda

Arthropoda. Standfuss liess in einer Reihe von Arbeiten verschiedene, darunter sehr extreme Temperaturen auf empfindliche Puppenstadien einwirken.

4. Pisces

Pisces. Vergl. Rauber (Sitz. Ber. naturf. Ges. Leipzig 1883). Sein Untersuchungsobjekt waren Forelleneier.

5. Amphibien

Amphibien. O. Hertwig (Sitz.-Ber. Akad. Wiss., Berlin 1894, Bd. 17), derselbe (Arch. mikr. Anat. Bd. 51 1898), Lille und Knowlton (Zool. Bull. Bd. 1, 1897), O. Schultze (Anat. Anz. Bd. 10), Bataillon (Arch. Entwickelungsmech. Bd. 12), Born, (Arch. Entwickelungsmech. Bd. 4). Nach letzterem ist es durch den Einfluss von Kälte und Wärme zu erreichen, dass man zur Laichzeit spät laichender Arten Eier von solchen einer früh laichenden Art auf annähernd demselben Entwickelungsstadium hat, wenn man nämlich die Entwickelung der letzteren durch die Kälte verzögert und sie erst in dem gewünschten Zeitpunkt durch Anwendung wärmeren Wassers nach O. Hertwig und O. Schultze beschleunigt.

6. Vögel

Vögel. Kaestner setzte Hühnereier, die im Brutofen lagen, eine Zeit lang einer Temperatur von 21°, 10° und 5° aus. Er sah dabei, dass nach der 18. Bebrütungsstunde der Embryo bei direkter Übertragung aus dem Brutofen in eine Temperatur von 10° und 5° regelmässig nach 1—2 stündiger Abkühlung abstirbt, dass dies aber nicht der Fall ist, wenn derselbe zunächst für einige Zeit in eine mittlere und dann erst in die kalte Temperatur gebracht wird.

Verhinderung der Luftzufuhr

Verhinderung der Luftzufuhr. Bei Hühner- oder anderen Vogeleiern wurde die Behinderung der Luftzufuhr dadurch herbeigeführt, dass die Eier mit Kaliumsilikat (solution du Codex; Féré) oder mit Lack, Kollodium und Öl (Saint-Hilaire, Dareste und Mitrophanow) bestrichen wurden. Nach Mitrophanow ist es zweckmässig, mit der Bestreichung des Eies noch die Einwirkung der erhöhten Temperatur zu verbinden.

Erhöhter und verminderter Luftdruck

Einwirkung von erhöhtem und vermindertem Luftdruck. Henking für Insekteneier; Rauber für Froscheier und Froschlarven.

Chemische Reizmittel

Chemische Reizmittel. Die angewandten chemischen Stoffe sind zahlreich.

a) Echinodermen

Echinodermen. Loeb befruchtete in normalem Seewasser, ersetzte dasselbe aber nach 10 Minuten durch Seewasser, dem (für das Arbaciaei) 100 Prozent seines Volumens an Aq. dest. zugefügt war. O. und R. Hertwig liessen auf befruchtete Eier

1. eine 0,5 proz. Lösung von Chloralhydrat in Meerwasser für 10—15 Minuten,
2. eine 0,05 proz. Lösung von Chininum sulfur. für 20—30 Minuten

einwirken. Der ersten Flüssigkeit wurden die Eier 1, $1^1/_2$, 5 und 15 Minuten nach der Besamung, der zweiten dann ausgesetzt, wenn der bläschenförmige Kern die Form einer Spindel angenommen hatte. Künstliche Dottermembranen erzielte Herbst durch Übergiessen der Eier mit einer geschüttelten und dann filtrierten Mischung von 50 ccm Meerwasser und 3 ccm Benzol. Weiter untersuchte derselbe Forscher den Einfluss des Lithiums, Natrium butyric., des Mangansulfates und Borax und suchte ferner auf experimentellem Wege alle diejenigen chemischen Stoffe zu ermitteln, die zur Entwickelung der Seeigellarven notwendig sind. Norman wandte bei Seeigel- (Ctenolabrus- und Fundulus-)Eier eine Erhöhung der Konzentration des Seewassers durch Zusatz von Magnesiumchlorid und Kochsalz an.

Loeb gebrauchte bei Arbacia Säure- und Alkalilösungen und zwar $^1/_{10}$ normale HCl-Lösung und $^1/_{10}$ normale NaOH-Lösung, die je 100 ccm Seewasser zugesetzt wurden. Die HCl-Lösung mischt sich klar in Seewasser, letztere bildet mit demselben einen Niederschlag, der bei grösserer Menge abfiltriert werden muss, da er die

Entwickelung der Eier hindert. Bei Zusatz von 2 ccm der $^1/_{10}$ normal Natronlauge bleibt 1,4 ccm in Lösung, es bildet sich ein nur sehr geringer Niederschlag, der eben deshalb nicht abfiltriert zu werden braucht. Morgan experimentierte bei Arbacia (und Chaetopterus) mit Lösungen von Chlornatrium, Chlorkalium, Chlormagnesium und Strychnin (das reine oder schwefelsaure Alkaloid), Wilson bei Toxopneustes mit NaCl, $MgCl_2$, $MgCO_2$.

b) Insekten

Insekteneier. Henking brachte die Eier während ihrer Entwickelung in ein Gemisch von $^2/_3$ Luft und $^1/_3$ Sauerstoff oder in reine Kohlensäure. In das erstere Mittel kamen sie auf 2—3 Stunden, in das zweite für 50 Minuten, entweder gleich nach der Ablage oder nach Verlauf von 2—3 Stunden ungestörter Entwickelung.

c) Amphibien

Amphibieneier. O. Hertwig liess Froscheier sich in verschieden starken Kochsalzlösungen entwickeln; dasselbe tat Tonkoff bei Tritoneiern; die Kochsalzlösungen waren hierbei 0,5—1 proz. Lösungen in Leitungswasser. Wilson liess auf Eier von Amblystoma, Rana in verschiedenen Stadien der Entwickelung 0,6—1 proz. Kochsalzlösung, 0,4—0,6 proz. Lösung von Lithiumchlorid und folgende Salzmischung, sogenannte Ringer'sche Lösung einwirken: 0,7 proz. Kochsalzlösung 100, 1 proz. Lösung von Chlorkalium 3, Calciumphosphat bis zur Sättigung. Gurwitsch brachte Frosch- und Kröteneier in 0,3—1 proz. Lösungen von Bromnatrium; Strychnin wirkte bei den Versuchen desselben Forschers ein in einer Konzentration von 1—$^1/_2$‰, Koffein in 0,25 und 0,12%, Nikotin in 5 : 10000, Glykose in 1 und 2%. Bataillon und Henneguy liessen eine ganze Reihe anorganischer und organischer Stoffe, u. a. auch (Henneguy) Strychnin und Veratrin in Lösung von 1 : 10000 $^1/_2$—$1^1/_2$ Stunden auf unbefruchtete (Henneguy) und befruchtete (Bataillon) Froscheier einwirken. Roux brachte befruchtete Froscheier in schwache Glyzerin- und Boraxlösung. Den Einfluss des Sauerstoffes auf Amphibieneier untersuchten Samassa, Schultze und Godlewski, der auch zugleich den Gaswechsel der sich entwickelnden Eier zu bestimmen suchte und einige für die Versuche wichtige Respirationsapparate beschreibt, wie den Atmungsapparat von Godlewski sen., einen Apparat zur Bestimmung der Kohlensäure, den gasanalytischen Apparat Mangin's und Bonnier's und das Kulturglas von Kitasato.

(Einfluss des Sauerstoffs auf Amphibieneier: P. Bert; auf Hühnereier: Pott; auf Askaris: Samassa.)

(Ätherisierung durch Zusatz von etwa 2,5% Äther zum Seewasser wandte Wilson an.)

d) Vögel

Hühnereier: Féré setzte die Eier den Dämpfen folgender Stoffe aus: Äthylalkohol; Chloroform; Phosphor; Moschus; Tabak; Nikotin; Ammoniak. Er injizierte in dieselben Äthylalkohol; Propylalkohol; Rum und Weiss- und Rotwein: Brantwein; dest. Wasser; Atropin; Morphium; Strychnin; Cocain und Nikotin; verschiedene Toxine und Gifte. Kochsalz; Pepton; Kreatin; Xanthokreatin und Papain. Ähnliche Injektionsversuche machte Schimkewitsch.

Elektrizität

Elektrizität. Den Einfluss des konstanten elektrischen Stromes auf Amphibieneier untersuchte Rossi.

Licht

Einfluss verschiedenfarbigen Lichtes. Die Einwirkung verschiedenfarbigen Lichtes ist meist in der Weise studiert worden, dass man die Eier — in der Mehrzahl der Fälle waren es wieder Amphibieneier — unter gefärbten Glasschalen sich entwickeln liess. Das Absorptionsvermögen des Glases wurde mit Hülfe des Spektrometers geprüft. Da es nun sehr schwer und mit grossen Kosten verknüpft ist, für alle Lichtarten einwandsfreies Glas zu bekommen, so gestaltete ich unter Zugrundelegung einer Landolt'schen Arbeit[1]) die Versuchsanordnung in anderer Weise. Landolt hat nämlich gezeigt, dass, wenn eine Auerlampe als Lichtquelle benutzt wird, man mit Hülfe bestimmter Strahlenfilter fast vollkommen monochromatisches Licht für Rot, Gelb, Grün und Blau erhalten kann. Der von mir angegebene, von Schmidt und Haensch konstruierte Apparat ist auf Seite 73 abgebildet und beschrieben. Die notwendigen Filterflüssigkeiten sind die folgenden:

A. Rot: Krystallviolett 5 BC und Kaliummonochromat.

Man löst 1. 0,05 gr. Krystallviolett in wenig Alkohol und verdünnt mit Wasser auf 1 Liter. Die Flüssigkeit gibt in 20 mm dicken Schicht ein Spektrum, das aus einem roten Bande und einem breiten blauvioletten Teile besteht.

Man löst 2. 10 gr Kaliummonochromat in 100 ccm Wasser. Durch Verschalten dieser Lösung ebenfalls in 20 mm dicken Schicht entfernt man den blauvioletten Teil des Spektrums.

---

[1]) Herr Dr. L. Spiegel (Berlin) hatte die Freundlichkeit, mich auf diese Arbeit aufmerksam zu machen.

B. Grün: Kupferchlorid und Kaliummonochromat.

Man löst 1. 60 gr $CuCl_2$ + 2 aq. zu 100 ccm. Dieser Filter lässt in einer Schicht von 20 mm nur grüne und blaue Strahlen durch.

Man löst 2. 10 gr Kaliummonochromat in 100 ccm Wasser. In einer 20 mm dicken Schicht nimmt die Flüssigkeit das Blau des vorigen Spektrums bis auf ganz geringe Reste fort.

C. Blau: Krystallviolett 5 BO und Kupfervitriol.

Man löst 1. Krystallviolett 5 BO zu 0,005 gr in 100 ccm Wasser. 2. Kupfervitriol zu 15 gr in 100 ccm Wasser. Beide Flüssigkeiten werden in Cüvetten von 20 mm Wandabstand gefüllt. Es resultiert nach Vorsetzen derselben vor die Lampe ein dunkelblaues Spektrum.

D. Gelb: Nickelsulfat; Kaliummonochromat und Kaliumpermanganat.

Man löst 1. 30 gr Nickelsulfat in 100 ccm aq. dest. 2. 10 gr Kaliummonochromat in 100 ccm aq. dest. 3. Kaliumpermanganat zu 0,025 gr in 100 ccm aq. dest. Das Nickelsulfat wird in 20 mm, die beiden anderen Substanzen je in 15 mm dicker Schicht vorgeschaltet und zwar befindet sich der Lampe zunächst das Nickelsulfat, dann folgt das Kaliummonochromat und schliesslich das Kaliumpermanganat. Es resultiert ein orangegelbes Band im Spektrum. Man bekommt die Farben bei der Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation, Berlin; ihre Lösungen müssen dunkel stehen, die Kaliumpermanganatlösung häufig frisch bereitet werden.

Künstliche Furchungstypen

Um Furchungstypen durch künstliche Teilung von Öltropfen zu erzeugen, verfährt Roux folgendermaſsen: „In ein gewöhnliches kegelmantelförmiges, für manche Zwecke (2 Tropfenreihen übereinander) in ein ausgebauchtes Weinglas, wird eine Mischung von Alkohol und Wasser getan; in diese ist ein Tropfen des zu verwendenden Öles (Provencer- oder Paraffin-Öl) zu werfen, und wenn derselbe zur Oberfläche aufsteigt, ist Alkohol, wenn er zu Boden sinkt, Wasser so lange zuzusetzen, bis er nahe der oberen Fläche der Flüssigkeit schwimmt. Darauf giesst man soviel Öl zu, dass die sich bildende grosse Ölkugel die Wandung des Glases ringsum leicht berührt.

„Hat man die Wasser-Alkohol-Mischung von geeignetem spezifischem Gewicht im Vorrat in einer Flasche zurecht gemacht, so

ist sie ganz gleichartig; ein in ihr schwimmender Öltropfen wird daher kugelrund, was für manche Versuche von Vorteil ist. Erstrebt man jedoch möglichst starke Abplattung der durch Teilung des ersten Tropfens hervorgebrachten Tropfen aneinander, so ist es besser, in einer Flüssigkeit zu arbeiten, welche unten dichter, oben dünner ist. Das Öl bildet dann statt einer Kugel eine wagerechte Ölplatte, deren Teilstücke die gewünschte Eigenschaft darbieten und zugleich nicht ganz so rasch wieder konfluieren, als dies im homogenen Medium schon bei geringerer Abplattung unter sonst kugeligen Tropfen geschieht.

„Um solche flächenhafte Ausbreitung des Öles zu erlangen, bereitet man die Suspensionsflüssigkeit stets frisch im Versuchsglase. Dies geschieht, indem man zuerst etwas Wasser eingiesst und danach mit nur wenig Wasser versetzten käuflichen (96 %) Alkohol darauf giesst. Schwimmt das nun zugesetzte Öl zu tief, so wird der Alkohol mit der Pipette abgesaugt, bis das Öl die gewünschte, den Rand des Glases rings fast berührende Platte bildet. Ist der Tropfen dagegen oben auch am Rande nur wenig benetzt, so wird mit noch weniger Wasser versetzter Alkohol rings am Rande mit der Pipette zugesetzt.

„Man darf nie unverdünnten 96proz. Alkohol verwenden, da seine Anwesenheit die Tropfen am Glase haften und untereinander konfluieren macht. Man bereite sich also gleich eine Flasche voll von einer beim Versuche mit dem angewandten Öle (Provenceröl, Brennöl, Paraffinöl) als passend sich erweisenden Mischung. Dies ist ein Hauptpunkt bei den Versuchen; denn das Haften des Öles am Glas und das rasche Konfluieren der Tropfen bereitet die wesentlichsten Beobachtungshindernisse. Zusatz einiger Tropfen verdünnter Essigsäure zum Wasser, sowie zur Alkoholmischung hat sich gegen das Haften an der Wand manchmal als günstig erwiesen. Die Tropfen halten sich am längsten ohne zu konfluieren, wenn keine lebhaften Diffusionen in dem Medium mehr stattfinden, also einige Zeit nach der Zubereitung des Versuchsfeldes.

„Durch Zusatz von Kalkwasser zum Alkohol statt des Wassers und Überneutralisation desselben mit Essigsäure, ebenso durch Zusatz von Müller'scher Lösung zum Wasser ist es mir manchmal gelungen, Medien herzustellen, in welchen die Tropfen weniger leicht konfluierten als bei Verwendung reinen Wassers mit Alkohol.

Hat man zufällig die Verhältnisse in Bezug auf Nichtzusammenfliessen der Tropfen besonders günstig getroffen, so empfiehlt es sich, sogleich die schwereren Versuche mit 6 und 8 sich pressenden Tropfen anzustellen, da für Versuche mit bloss 4 Tropfen auch weniger günstige Verhältnisse ausreichen, und da es manchmal trotz anscheinend einer günstigen früheren gleichen Versuchsanordnung nicht gelingt, das vorzeitige Konfluieren der Tropfen zu verhüten.

„Die Teilung des Öltropfens geschieht mit einem 2—3 mm dicken Glasstabe. Bei der ersten Teilung geschieht dies, indem man mit ihm dicht an der Wandung des Gefässes bis unter den grossen Tropfen eindringt und dann die Ölkugel durchschneidet. Bei den späteren Teilungen führt man den Stab in der Mitte des Raumes ein und schneidet von da gegen die Wandung. Am Ende jeder Teilung wird der Stab stets derart von unten nach oben gezogen, dass er mit der unteren Spitze die Wand des Glases gleitend berührt; dies geschieht, um die neuen Tropfen bis auf den letzten feinen Verbindungsfaden zu durchtrennen. Der Glasstab darf bei der Teilung nie vom Öl henetzt werden oder es vorher schon sein."

Verwachsungsversuche

Für **Verwachsungsversuche bei Amphibienlarven** sind nach Born die besten Versuchsobjekte die Larven von Rana esc., die eine Länge von 3—3,5 mm haben. Aus ihren Hüllen gepellt und operiert werden die Larven in physiologischer Kochsalzlösung. Über die Einzelheiten der Operation äussert sich Born wie folgt: „Ich führe die Schnitte jetzt nur noch mit einer äusserst scharf und glatt geschliffenen, stark konvex schneidigen, dünnen Impflanzette aus, deren Klinge gegen den Griff etwa in einem Winkel von 120° festgestellt ist. Um die Schneide zu schonen, wird die Operation in Pappschalen oder in mit Kork ausgelegten Glasschalen vollzogen. Fixieren kann man sich dabei die sehr weichen Larven nicht, höchstens dass man sie mit einem feinen Pinsel, den die linke Hand führt, während des Schnittes in richtiger Lage zu halten sucht. Geht ein Schnitt fehl, so wird die Larve verworfen; der Schaden ist nicht gross, denn in den geeigneten Wochen ist immer mehr Material vorhanden, als man bewältigen kann.

„Aus der Operationsschale werden die angeschnittenen Tiere mit dem Glasrohr in flache Glasschalen mit möglichst ebenem Boden übertragen, in denen sie zusammengesetzt werden sollen. Natürlich

sind auch diese Schalen mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt, aber nur so weit, dass die Larven etwas bedeckt sind. Das Instrumentarium, das ich zum Zusammensetzen und Fixieren brauche, ist ein sehr einfaches. Eine gut fassende Nickelinpinzette, ein handlich gestieltes Spatel aus dünnem Nickelinblech, dessen zungenförmig verbreitertes Ende etwa 4 mm lang und 2 mm breit ist (die Ränder der Zunge dürfen nicht scharf, sondern müssen abgerundet sein), einige feine, weiche Pinsel und verschiedene Stücke Silberdraht. Über letzteren noch ein paar Worte. Ich besitze einen grossen Vorrat verschiedener Drähte von 0,4 bis 1,5 mm Dicke. Die Länge der Stücke variiert von 1—$1^1/_2$ cm. Die Enden sind teils mit der Kneipzange abgeschnitten und dann meisselförmig zugeschärft, teils quer abgestutzt. Der Gebrauch derselben wird sich aus dem Folgenden ergeben.

„Zuerst werden die beiden zu vereinigenden Larven oder Larventeilstücke mit dem Pinsel vorsichtig einander genähert und möglichst in die gewünschte Lage gebracht. Auch dabei, wie bei den folgenden Prozeduren arbeite ich unter der Lupe. Wer daran gewöhnt ist, kann mit Vorteil eine Brillenlupe benutzen, ein Kurzsichtiger kommt vielleicht ohne jedes optische Instrument aus.

„Liegen die Teilstücke annähernd in der gewünschten Lage aneinander, so handelt es sich jetzt darum, sie in dieser Lage zu fixieren, die Lagerung noch genauer zu korrigieren und dabei die Wundflächen gelinde aufeinander zu pressen. Das ist der heikelste Teil der Arbeit, aber lange nicht so schwierig, als vielleicht mancher von vornherein vermuten möchte. Ich habe schon im Jahre 1894, bald nachdem ich den Vortrag in der Schles. Ges. für vaterl. Kultur veröffentlicht hatte, alle dort auf pag. 4 beschriebenen Hilfsmittel der Fixierung bei Seite gelassen und mich zur Fixation der Larven späterhin ausschliesslich der Silberdrähte bedient. Dies geschah aber in etwas anderer und besserer Weise, als es dort angegeben ist. Ich habe die Silberdrähte nie mehr direkt auf die Larven gelegt; die dadurch bedingte Schnürfurche verschwindet zwar meistens nach einigen Tagen spurlos (namentlich bei recht lebenskräftigen Larven am Anfang der Laichperiode), aber doch durchaus nicht immer. Jedenfalls ist die Beifügung einer so groben Verletzung, wenn möglich, zu vermeiden. Als Prinzip galt fortan, dass die Larven nicht mehr gedrückt werden dürfen, als für die

Fixierung unumgänglich notwendig ist. Ich erreiche dies dadurch, dass dicht neben die Larven zwei Silberdrähte gelegt wurden, deren Durchmesser etwas geringer war, als der Leib der zu fixierenden Larven. Quer über diese und über die Larven hinweg wurden dann die fixierenden Drähte aufgelegt, so dass die ersten Drähte als Schienen dienten, welche die Larven vor zu starkem Drucke schützten. Noch häufiger genügt ein blosses Anlegen von Drähten in der gleich näher zu schildernden Weise; man kann sich dann das Auflegen von Drähten ganz ersparen.

„Das spezielle Verfahren muss sich natürlich nach dem jeweilig vorliegenden Falle richten. Es wird vielleicht am besten sein, wenn ich zwei bestimmte, einfache und häufigere Fälle herausgreife und mein Vorgehen bei diesen beschreibe.

„Nehmen wir erstens an, es handele sich darum, eine gleichsinnige Bauchvereinigung zweier Larven zu Stande zu bringen. Jede der Larven hat einen flachen Schnitt an der Konfexität des Bauches erhalten, durch den ein Längsoval der Haut mit einer Lage Dotterzellen entfernt ist. Die Larven sind mit dem Pinsel so zusammengeschoben, dass die Schnittflächen sich berühren. Natürlich ist es wünschenswert, dass die Schnitte möglichst gleich gross und gleich geformt sind und genau an der grössten Konvexität des Bauches liegen. Doch schaden kleinere Abweichungen und Unregelmäſsigkeiten durchaus nicht. Nun wird mit der Pinzette dicht an den Rücken jeder Larve ein Drahtstück angelegt, das etwas dünner ist, wie die Larve selbst. Mit dem Spatel wird die Stellung vorsichtig, aber genau korrigiert und die Drähte werden mit demselben Instrument etwas gegen die Rücken der Larven angedrückt, so dass die Schnittflächen gelinde aufeinander gepresst werden. Nun wird ein drittes Drahtstück quer über die Schienen und die Kopfenden vorsichtig hinweggelegt und die Aufeinanderpassung und Fixierung ist, wenn das Glück gut ist, fertig. Zeigen sich Abweichungen, biegt sich z. B. ein Schwanzende ab, so muss das Ende eines Drahtes an- oder aufgelegt werden, das den Schwanz in die richtige Stellung bringt und in derselben festhält.

„Man kann aber auch ganz ohne aufgelegte Drähte auskommen. Liegen die Larven mit den Bauchwunden richtig aneinander, so legt man an die Mitte jedes Rückens das meisselförmige Ende je eines dicken Drahtes an, die beiden Drähte drängen die Larven etwas

gegeneinander. Damit die Larven nun nicht durch die Wirkung der Flimmerhaare zwischen den Drahtenden kopfwärts herausschwimmen, wird an jedes Kopfende je ein Draht parallel der Längsachse der Larve angelegt, der dasselbe zurückhält, ja etwas nach rückwärts drängt. Divergieren die Schwanzenden, so helfen zwei dieselben zusammenschiebende Drähte nach. Ich bin sehr häufig mit sechs so radiär angelegten Drahtstücken ohne jede Auflagerung von Drähten ausgekommen.

„Die Larven von B. igneus sind bald nach Schluss der Medullarröhre dorsalwärts konkav gebogen; — dies erleichtert manche Arten der Vereinigung, andere werden dadurch erschwert. Bei der Bauchvereinigung braucht man mitunter nur je einen Draht an die Rückseite anzulegen und diese Drähte etwas gegeneinander zu drängen. Die Enden der halbmondförmig gebogenen Larven fangen sich dann unter den Drähten, die Larven werden gewissermaſsen federnd gegen einander gepresst und die Vereinigung gelingt ohne Zuhilfenahme anderer Mittel.

„Ein häufiger Übelstand ist der, dass die Schnittfläche bei einer Larve nicht genau an der grössten Konvexität, sondern mehr an einer Seitenfläche des Bauches gelegen ist. Dann muss vom Rücken her unter die betreffende Larve ein dünner Silberdraht untergeschoben werden, bis dieselbe soweit gedreht ist, dass die Wundflächen zum Kontakt kommen. Auf- und angelegte Drähte müssen die Fixierung vollenden.

„Als zweites Beispiel will ich die Art der Fixierung etwas genauer schildern, wenn es sich darum handelt, die Längsvereinigung zweier quer durchschnittener Stücke zu erzielen. Nehmen wir an, wir hätten die eine Larve etwas hinter der Mitte, die andere etwas vor der Mitte des Rumpfes durchschnitten, und es wäre die Aufgabe, die beiden Stücke zur Verwachsung zu bringen, damit eine etwas zu lange Larve entsteht. Auf den ebenen Boden des Glasgefässes legt man sich in passender Richtung ein dickeres Drahtstück (von 1—$1^1/_2$ mm Durchmesser). Die beiden Teilstücke werden mit dem Pinsel vorsichtig an dasselbe herangebracht und bei Aneinanderlagerung der Schnittflächen mit den Rückenkanten unter den Draht geschoben. Sollte derselbe dabei nicht ruhig und fest genug liegen, so stützt man ihn durch ein von der anderen Seite senkrecht angelegtes Drahtstück. Nun kommt an das Schwanz- und Kopfende

der Teilstücke je ein der Längsachse derselben annähernd parallel angelegter Draht, der die Stücke gelinde aufeinander presst. Zwei nahe der Vereinigungsfläche angelegte Drahtenden verhindern das Ausweichen nach der ventralen Seite.“ (Born; Arch. Entwickelungsmech. Bd. 4, p. 365—369.)

Die weitere Aufzucht der operierten Tiere wird zuerst in gut durchlüfteter physiologischer Kochsalzlösung, sodann in ebenfalls gut durchlüftetem reinem Wasser vorgenommen. Die Übertragung aus der Kochsalzlösung in das Wasser muss langsam mit Dazwischenschalten immer schwächerer Salzlösungen erfolgen.

Bastardierung

Bastardierungsversuche (vergl. V. Häcker, Praxis und Theorie etc., Jena 1899, Seite 214—216; Seite 218—221).

Bei den Bastardierungsversuchen, die hauptsächlich bei Echinodermen angestellt sind, ist noch mehr als bei der künstlichen Befruchtung überhaupt die peinlichste Sauberkeit nötig; „es ist absolut auszuschliessen, dass durch das Wasser oder die Instrumente Samen der gleichen Art zu dem mit fremdem Samen zu befruchtenden Eiern gelangt. Fliessendes Süsswasser ist das beste Mittel, um Täuschungen auszuschliessen: man hat mittels desselben Gefäss, Schere und vor allem die Pipette, mit denen man den Samen entnimmt, in nachdrücklichster Weise zu reinigen, letztere dadurch, dass man durch dieselben den Strom der Wasserleitung längere Zeit hindurchjagt. Durch Kontrollgefässe mit unbefruchteten Eiern kann man sich passend von dem Erfolg der angewandten Reinigungsoperation überzeugen: ist in ihnen kein Ei befruchtet, so darf mit grosser Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, dass auch in die eigentlichen Versuchsgefässe kein unerwünschtes Spermatozoon hineingelangte.

„Was die Reinigung des Wassers von Spermatozoen anbelangt, so bietet Filtrieren keine absolute Garantie des Freiseins von Wasser und verdirbt oft das Wasser (Driesch). Vielmehr hat man Seewasser zu kochen bezw. bis zum Beginn des Kochens zu bringen und dann abzukühlen.“ (V. Häcker.)

Um kernlose Eistücke zu erhalten, die dann mit Samen der gleichen oder einer fremden Art befruchtet werden, kann man entweder nach Delage das Ei unter dem Mikroskop zerteilen oder sich der Schüttelmethode von O. und R. Hertwig bedienen. Hier-

durch platzt die Dotterhaut und es werden Eifragmente abgerissen. Die kernlosen derselben werden unter dem Mikroskop sorgfältig herausgesucht, mit Hilfe von Pipetten isoliert und 2 Stunden in Seewasser stehen gelassen. Sieht man auch dann in ihnen keinen Eikern, so wird Sperma zugefügt (vergl. Häcker, Praxis und Theorie, Seite 218—219).

Ephebogenesis

Rawitz wandte bei seinen Versuchen über **Ephebogenesis** folgende Verfahren an: Er suchte mit Hilfe chemischer Substanzen ein Ausstossen des Eikernes und ein künstliches Reifen unreifer Samenelemente herbeizuführen. Seine Lösungen waren:

1. 4,7 proz. Lösung von Magnesiumchlorid 150
   2,1 proz. Lösung von Borax 45
   0,1 proz. Lösung von Calciumphosphat 5

„Diese Lösung eignet sich besonders, unreifen Samen zur Reife zu bringen.“

2. 4,7 proz. Lösung von Magnesiumchlorid . 60
   2,1 proz. Lösung von Borax 40

Diese Lösung dient zur Vermischung des reifen Samens. Zur Lösung des Calciumphosphates löst man 0,1 g in 100 Aq. dest. unter starkem Schütteln, lässt den Bodensatz sich absetzen und gebraucht nach 24 Stunden die klare Lösung.

A) Die unreifen Eier von Holothuria kommen in

Seewasser . . . . . 60 ccm
Lösung 1 . . . . . 30 „

Dann Zusatz von unreifem Samen derselben Spezies. Nach 2 Stunden Abgiessen dieser Lösung und Aufgiessen von

Seewasser 500
Lösung 1 50

B) Es kommen die unreifen Eier von Holothuria für zwei Stunden in

Seewasser 2
Lösung 2 1

Dann Zusatz von reifem Samen von Strongylocentotus lividus. Nach 3 Stunden Abgiessen und Aufgiessen von

Seewasser 500
Lösung 2 50

In beiden Fällen wird nach Rawitz der Kern der Eier ausgestossen, das zurückbleibende entkernte Ei aber trotzdem gefurcht.

In seiner zweiten Mitteilung modifiziert er die sub 1 und 2 erwähnten Lösungen wie folgt:

3. 4,7 proz. Lösung von Magnesiumchlorid 150
   2,1 proz. Lösung von Borax 45
   1,0 proz. Lösung von Natriumphosphat 5
4. 4,7 proz. Lösung von Magnesiumchlorid 150
   2,1 proz. Lösung von Borax 50

Um das Auftreten von Infusorien zu vermeiden, muss das Seewasser mehrfach filtriert werden, ehe es zur Verdünnung der Lösung benutzt wird.

Künstliche Parthenogenese

Künstliche Parthenogenese. Für die Versuchsanordnung über die Herbeiführung künstlicher Parthenogenese gibt Loeb folgende Winke. Die Verhältnisse variieren, je nachdem man an Arbacia-, Asterias-, Chaetopterus- und Amphitrite-Eiern experimentiert. In allen Fällen ist aber für genaue Sterisilation des Seewassers, der Instrumente, Hände und der Tiere selbst zu achten. Bei Arbacia entleeren die reifen Seeigel gern Sperma in das Seewasser, in welchem sie mit den Weibchen zusammen in das Laboratorium gebracht werden. Man muss daher die Weibchen „erst 24^h oder wenn möglich länger in spermfreiem Seewasser isoliert halten, ehe sie zu Versuchen ihrer künstlichen Parthenogenese benutzt werden.“ Um die unbefruchteten Eier zur Entwickelung zu bringen, versetzt man das Seewasser mit Kaliumchlorid. Loeb stellt sich eine Stammlösung her, die in einem Liter Wasser ungefähr 186 g KCl enthält. Hiervon mischt er zu 100 ccm Seewasser 8, 10, 12, 14, 16, 18 ccm. In diesen Mischungen bleiben die Eier $^1/_2$, 1, $1^1/_2$ und 2^h und kommen dann in reines Seewasser. Die Temperatur spielt eine wichtige Rolle; es ist nach Wilson und Doncaster ratsam, die Versuche bei einer Wassertemperatur von 20° C. anzustellen. Bei Asterias, Chaetopterus und Amphitrite genügt oft eine ganz leichte Erschütterung, um unbefruchtete Eier zur Entwickelung zu bringen. Man hat sich daher bei der Prüfung über den Einfluss anderer Medien auf die Parthenogenese ängstlich vor jeder Erschütterung der Eier zu hüten. Bei Asterias lässt sich Parthenogenese erzeugen durch Einwirken einer HCl-Lösung oder

durch Abkühlen der Eier auf Eis, bei Chaetopterus und Amphitrite durch Zusatz von 2 bis 5 ccm einer normalen Calciumnitrat- oder Calciumchloridlösung zu 100 ccm Seewasser. Die Amphitriteneier brauchen aus der Calciumlösung nicht in reines Seewasser zu kommen.

Literatur zu Kapitel 14.

E. Pflüger, Pflüger's Archiv Bd. 31, 1883. — O. Schultze, Arch. mikr. Anat. Bd. 55; Arch. Entwickelungsgesch. Bd. 1. Verh. physik.-med. Gesellsch., Würzburg 1899. — O. Hertwig, Arch. mikr. Anat. Bd. 42, 44; Arch. mikr. Anat. 53. Jen. Zeitschr. Naturwiss. Bd. 20, 24, 1890. Festschr. f. Virchow, 1891. — Rauber, Ber. naturf. Gesellsch. Leipzig 1884/1883. — Kathariner, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 12. — Morgan, ref, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 12; Arch. Entwickelungsmech. Bd. 2, 10/16. — Henking, Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. 8. — L. Gerlach, Anat. Anz. Bd. 2. — Féré, Journal de l'Anat. et de la physiol. 1900. — Boveri, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 2. — Roux. Anat. Anz. Bd. 9; Arch. Entwickelungsmech. Bd. 1/4. — K. Ziegler, Anat. Hefte Bd. 19, 1902. — Kopsch, Verh. anat. Gesellsch. Kiel 1898. — Spemann, Anat. Anz. Erg. H. 19; Arch. Entwickelungsmech. Bd. 12. — Driesch, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 1, 2. Mitt. Zool. Stat. Neapel Bd. 11 1893. — Fischel. Arch. Entwickelungsmech. Bd. 6. — Schaper, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 6. — v. Ebner, Festschr. f. Rollet. — Endres, 73. Jahresber. d. schles. Gesellsch. f. vaterl. Kultur 1895. — Herlitzka, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 2/4. — L. Sala, Sitz.-Ber. akad. Wiss. Berlin Bd. 33. — Standfuss, ref. nach Gebhardt, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 13. — Kaestner, Arch. Anat. Entwickelungsgesch. 1895. — Mitrophanow, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 1/10. — Loeb, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 1, 7, 13. — R. Hertwig, Anat. Anz. Bd. 1, 1886; Jen. Zeitschr. Naturwiss. Bd. 20. — Herbst, Biol. Centralbl. Bd. 13; Zeitschr. wiss. Zool. Bd. 55; Arch. Entwickelungsmech. Bd. 2, 5, 11. — Norman, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 3. — Wilson, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 12, 13, 5. — Schimkewitsch, Anat. Anz. Bd. 20. — Rossi, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 4. — Bataillon, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 12. — Tonkoff, Arch. mikr. Anat. Bd. 62. — Gurwitsch, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 3. — Henneguy, Bibl. anat. Bd. 9, Suppl. 1901. — Samassa, Verh. naturh. med. Verein Heidelberg N. F. 6. — Godlewski, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 11. — P. Bert, Rech. Physiol. expér. Paris 1878. — H. Landolt, Ber. deutsch. chem. Gesellsch. 1894 Bd. 27, 3, p. 2872. — Born, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 4. — Delage, Compt. rend. Akad. sc. 1898. — Rawitz, Arch. Entwickelungsmech. Bd. 11/12.

Kapitel 15

Rekonstruktion

Wir unterscheiden zwei Verfahren, die uns die körperliche Vorstellung des untersuchten Gegenstandes ermöglichen, nämlich die graphische (zweidimensionale) und die plastische (dreidimensionale) Rekonstruktion. Beide können in der Weise, wie es His getan, miteinander verbunden werden, indem man zuerst graphisch rekonstruiert und dann unter Kontrolle an der vom unzerlegten Objekt gemachten Zeichnung und unter Zuhilfenahme der durch die graphische Rekonstruktion gewonnenen körperlichen Vorstellung aus freier Hand modelliert. Bei der **graphischen Rekonstruktion,** so wie sie His, Krieger, Rosenthal und Froriep angewendet haben, unterscheidet man eine Rekonstruktion auf die Sagittalebene und eine solche auf die Frontalebene. His sagt darüber Folgendes: „Nachdem das Objekt bei einer bestimmten Vergrösserung als Ganzes gezeichnet, dann in Schnitte von bekannter Dicke zerlegt worden ist, und nachdem man auch die letzteren bei derselben Vergrösserung gezeichnet hat, sind die Unterlagen zu einer zuverlässigen Rekonstruktion beisammen. Die Ausführung dieser letzteren beruht auf sehr einfachen Grundsätzen. Ein Papierblatt wird in parallele Zonen eingeteilt, derart, dass jede Zone gemäss der angewandten Vergrösserung einer Schnittdicke entspricht. Bei Konstruktion von Sagittalprojektionen dient das in richtiger Neigung aufgetragene Rückenprofil als Grundlinie, bei Frontalprojektionen ein medianer Vertikalstrich. Die Distanzen der einzuzeichnenden Teile von diesen Grundlinien werden für jeden einzelnen Schnitt ausgemessen und an entsprechender Stelle in die Projektionszeichnungen eingetragen.

Graphische Rekonstruktion

„Man beginnt zunächst mit Verifizierung der Schnittrichtung und des äusseren Profils. Folgende Bedingungen sind dabei mafs-

gebend: Die anzulegende Zeichnung muss die Höhe haben, welche der Zahl und der Dicke der Schnitte entspricht, und es müssen an der Profildarstellung die durch die Urzeichnung kontrollierbaren äusseren Teile, Auge, Herz, Leber, Extremitäten u. s. w., in die richtige Höhe und in die richtigen gegenseitigen Abstände gelangen. Ist dieser Bedingung Genüge geleistet und sind auch im übrigen alle Operationen mit ausreichender Genauigkeit vollzogen worden, so wird das durch Konstruktion gewonnene Vorderprofil dem ursprünglich aufgenommenen gleich sein und beide Zeichnungen müssen sich decken. Wo dies nicht zutrifft, da ist der Grund der mangelnden Kongruenz aufzusuchen. Derselbe braucht nicht notwendig in fehlerhafter Abmessung der Schnittdicken zu liegen, vielmehr kann er in Verbiegungen liegen oder in Schrumpfungen, welche das Präparat zwischen der ersten Zeichnungsaufnahme und der Zerlegung erfahren hat. Danach können eventuelle Korrektionen des Konstruktionsbildes vorgenommen werden. Eine unschwer zu beurteilende Fehlerquelle liegt meistenteils in der unsicheren Dickenbestimmung der beiden Endschnitte einer Reihe.“ (His, Anatomie menschl. Embryonen, I, p. 10/11)

Über die Frontalkonstruktion aus einer Reihe von Querschnitten macht Rosenberg bei Beschreibung einer Abbildung seiner Arbeit folgende Angaben: „Auf dem zur Zeichnung benutzten Papier wurden einander parallele Linien gezogen, die einen Abstand (2 mm) von einander haben, der die Schnittdicke in der zu konstruierenden Figur repräsentiert. Senkrecht zu diesen Linien wurde ein zweites System von Linien eingetragen, die in Abständen von einander stehen, welche auf den Abstand der Teilstriche eines Okularmikrometers Bezug haben. Der (auf das Objekt bezogen) reelle Wert, den der Abstand der äussersten Teilstriche eines Okularmikrometers bei einer gegebenen, für die Anfertigung der Zeichnung benutzten Kombination besitzt, ist bekannt. Wird dieser Wert durch den der Schnittdicke dividiert und wird mit dem Quotienten die die Schnittdicke im zu konstruierenden Bilde repräsentierende Strecke (2 mm) multipliziert, so bezeichnet der erhaltene Wert den Abstand, den die Linien des zweiten Systems, welche den äussersten Teilstrichen des Mikrometers entsprechen, von einander haben müssen, womit auch der Abstand der übrigen, den einzelnen Teilstrichen des Mikrometers entsprechenden Linien gegeben ist. Das vorstehende

Bild, welches der Ebene eines Frontalschnittes, der die Chorda enthält, angehört, wurde mit Hilfe der erwähnten Linien erhalten, indem successive in jedem Schnitt die Ausdehnung, welche die im Schnitte vorliegenden Durchschnitte der betreffenden Skelettteile in frontaler Richtung besitzen, am Okularmikrometer abgelesen und mit Hilfe des zweiten Liniensystems die jedem Teil zukommende Stelle durch Punkte an den betreffenden Linien des ersten Systems markiert wurde, wobei die Chorda in die Mittellinie fiel. Die erhaltenen Punkte, durch Linien verbunden, ergaben die Figur, die dann in einer Camera obscura verkleinert wurde." (Rosenberg, Morphol. Jahrb. Bd. I, p. 108/109, Anm.)

Ein drittes Beispiel sei die Beschreibung einer Frontalkonstruktion aus Sagittalschnitten, wie sie Froriep in seiner Arbeit über die Entwickelung der Wirbelsäule anwendet. Er sagt dort: „Ich zeichne, wie zum Zweck einer jeden Konstruktion, die Serie bei konstanter, und zwar je nach der Grösse der Embryonen, behufs bequemer Vergleichung, nur entweder 50- oder 25facher Vergrösserung; pause sämtliche Zeichnungen durch, indem ich sie auf den gleichmäſsig beschnittenen Pausblättern sogleich so orientiere, dass benachbarte Schnitte genau aufeinander decken, und versehe die Pausen mit Orientierungszeichen, die es nun gestatten, auch weit voneinander entfernte Schnitte zusammenzupassen. Nachdem dann auf einem Karton die Schnittgrenzen bei der entsprechenden Vergrösserung in der bekannten Weise gezogen, wird rechtwinkelig zu denselben eine Linie als Basis des Konstruktionsfeldes eingetragen. In der Zeichnung des Medianschnittes wird durch eine Linie diejenige frontale Ebene bezeichnet, auf welche die Projektion erfolgen soll, und eine zweite zu jener rechtwinkeligen Linie liefert die Abszisse, auf welcher nun noch einige Koordinaten errichtet werden können. Mit Hilfe der bereits aufeinander orientierten Pausen wird dieses Liniensystem auf alle Zeichnungen richtig eingetragen und die von der Abszisse in den Zeichnungen aus gewonnenen Maſse können von der Abszisse des Konstruktionsfeldes aus zwischen die Schnittlinien eingetragen werden." (Froriep, Arch. Anat. Physiol. anat. Abtlg. 1883, pag. 178/179.)

Richtungsebenen und Richtungszeichen

Mit der Einführung der sogenannten Richtungsebenen und den bei ihrem Durchschnitt erhaltenen Richtungszeichen in die graphische Rekonstruktion ist dieses Verfahren zu einer noch exakteren

wissenschaftlichen Forschungsmethode geworden. Unter Richtungsebenen oder Definierflächen (Kastschenko) versteht man Ebenen, die senkrecht zur Schnittfläche stehen. Sie können in der Einzahl oder in der Mehrzahl vorhanden sein; in letzterem Falle können sie sich unter einander in einem rechten oder in beliebigen Winkeln schneiden, immer aber muss ihr Schnittwinkel mit der Schnittfläche des Präparates ein rechter sein. Bringt man auf den Richtungsebenen vertikal verlaufende Linien oder Rinnen an, so erscheinen diese sogenannten Richtungslinien (Richtungsrinnen) im Durchschnitt als Punkte oder Zacken. Ein jeder mit dem Mikrotom angefertigte Schnitt zeigt also nicht nur das durchschnittene Objekt, sondern auch das zugehörige Richtungszeichen (den Richtungspunkt oder die Richtungszacke). Von ihnen weiss man, dass sie einer senkrecht stehenden Linie oder Rinne angehören; hat man daher das durchschnittene Organ aus den Schnitten wieder aufzubauen, so muss man die einzelnen Richtungszeichen so aufeinander legen, dass ihre Gesamtheit eine genau senkrecht verlaufende Linie oder Rinne bildet. Auf diesem Prinzip beruht die plastische (körperliche) Rekonstruktion, die uns weiter unten beschäftigen wird. Vor der Hand wollen wir die Anfertigung dieser Richtungszeichen und ihre Verwendung bei der graphischen Rekonstruktion auseinandersetzen.

Wenn man davon absieht, dass im Embryo selbst Gebilde enthalten sind, die ganz oder wenigstens teilweise annähernd senkrecht verlaufen und deren Durchschnitte daher bis zu einem gewissen Grade wie die der Chorda als Richtungszeichen dienen können, so kommen als solche in Betracht: Fäden (Strasser), Nervenfasern aus den Bündeln in der Cauda equina des Menschen, wie sie neuerdings in einer ausführlichen Arbeit Wilson empfiehlt, oder Eiweissplatten (Born), die alle in der notwendigen Orientierung, d. h. senkrecht zu der zukünftigen Schnittfläche mit dem Objekt eingebettet werden. Oder man legt nach Strasser das Präparat in der gewünschten Lage in ein Papierkästchen und bettet dieses mit ein. Die Durchschnitte der Wände des Kästchens, die als Linien erscheinen, dienen dann als Richtungszeichen. Noch ein anderes Verfahren besteht darin, dass man innerhalb des Paraffinblockes senkrechte Stichkanäle anlegt und diese mit Farbe füllt (Strasser). All das erfüllt seinen Zweck aber unvollkommen. Da kam man schliesslich auf die Idee, nach vollzogener Einbettung

den Paraffinblock selbst so herzurichten, dass er mindestens eine zur Schnittebene genau senkrechte Fläche besitzt, die dann als Richtungsebene dient. Dies wird erreicht mit dem Born'schen Ortostaten, dem Strasser'schen Verfahren, mit dem Apparat von Kastschenko und von Suzuki. Besonders der Apparat von Kastschenko fand vielen Anklang. Er erlaubt es, nicht nur eine, sondern eine ganze Anzahl sich stumpfwinkelig schneidender Richtungsebenen herzustellen. Ich selbst verwende einen Apparat, der schon lange im anatomisch-biologischen Institut gebraucht und unter Änderung des alten Breslauer Modells von dem Präparator des Institutes angefertigt wird. Er gestattet die Anlegung nur einer Richtungsebene, was aber für die meisten Fälle genügt. Er ist in Abbildung 27 dargestellt.

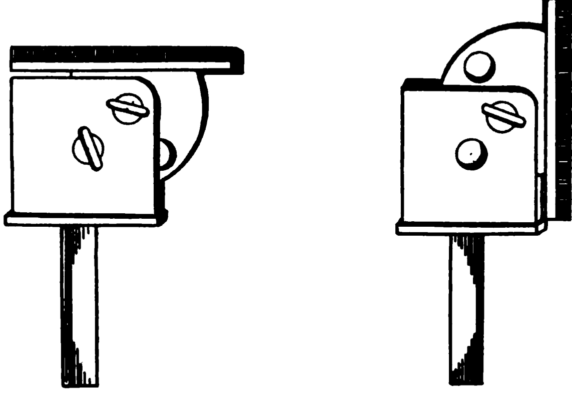


Fig. 27.

Mit dem Born'schen Orthostaten und ebenso mit dem Strasser-schen Verfahren werden zugleich mit Herstellung der Richtungsebene innerhalb derselben senkrecht und parallel verlaufende Richtungsrinnen erzeugt. Hat man dagegen eine glatte Richtungsebene, so muss man nachträglich die Richtungsrinnen einkratzen. Das geschieht mit sogenannten „Ritzern". Der „Rechen" von Strasser ist solch ein Instrument. Aber während man bei diesem den Block zur Anlegung der Richtungsrinnen von dem Mikrotom nehmen muss, ist das bei den anderen Ritzern nicht nötig. Sie werden an dem Mikrotommesser befestigt und mit demselben über die Richtungsebene geführt. Solche Ritzer haben Keibel, Stoss, Alexander

u. a. m. angegeben. Sehr zweckmäſsig ist der Ritzer von Rich. Magen, Berlin, besonders deshalb, weil er bei quer und schräg gestelltem Messer angewendet werden kann. Er ist in Abbildung 28 dargestellt. Ich hebe hervor, dass ich bei der Konstruktion desselben Herrn Magen,[1]) der von Anatomen viel beschäftigt wird, nur meine speziellen Wünsche auseinandergesetzt, ihm aber die Konstruktion im Einzelnen vollkommen überlassen habe. Es wäre daher möglich, dass der Apparat Anklänge aufwiese an andere vielleicht früher für andere Forscher gebaute Apparate. Soviel für eventuelle Prioritätsansprüche.

Messerhalter nach Jung-Röthig

Hat man ein umfangreicheres Objekt, das für eine spätere Rekonstruktion bestimmt ist, in Schnittreihen zu zerlegen, so kommt

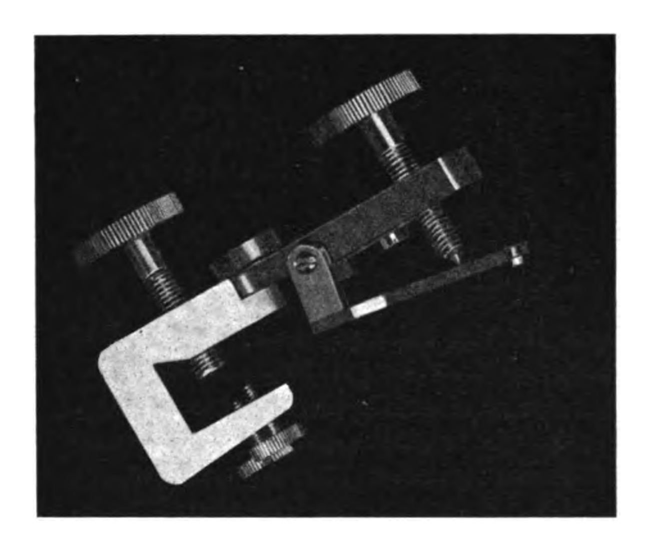


Fig. 28.

es im Verlauf der Serie häufig vor, dass man das Mikrotommesser seitlich zu verschieben wünscht, um mit einer neuen Stelle desselben zu schneiden. Das ist, wenn man das Messer innerhalb der Messerklammer verschiebt, stets verbunden mit einer beträchtlichen Abweichung von der vorher innegehabten Schnittrichtung, und dadurch

[1]) Nach dem Ableben des Herrn Magen ist der Apparat durch die mechan. Werkstatt von F. Schmidt Berlin N.W. Thurm-Str. 46 zu beziehen.

leidet die Exaktheit der späteren Rekonstruktion. Ich habe mir aus diesem Grunde, unter Abänderung des Modells der Jung'schen Klammer, einen neuen Messerhalter von R. Magen, Berlin,[1]) anfertigen lassen. Er ist in Abbildung 29 von oben gesehen dargestellt; brauchbar ist er nur für das Mikrotom von Schanze.

Das Messer kommt in die Trommel von A, wie gewöhnlich, die Schraube auf dem Messerschlitten des Mikrotoms in den Ausschnitt C. Mit ihrer Hilfe wird der Halter am Schlitten festgeschraubt. Die untere, in der Zeichnung nicht sichtbare Fläche von B ist absolut plan, und ebenso die obere Fläche des Messerschlitten des Mikrotomes, auf der sie ruht. Infolge des Ausschnittes C kann man den ganzen Messerhalter und Messer verschieben, und da die beiden eben erwähnten Flächen vollkommen eben sind, so erfolgt die Verschiebung innerhalb der vorher innegehabten Schnittfläche. Der Apparat hat sich sehr gut bewährt; eine Fehlerquelle liegt nur in Unebenheiten der Messerschneide; sie fällt aber praktisch durchaus nicht ins Gewicht.

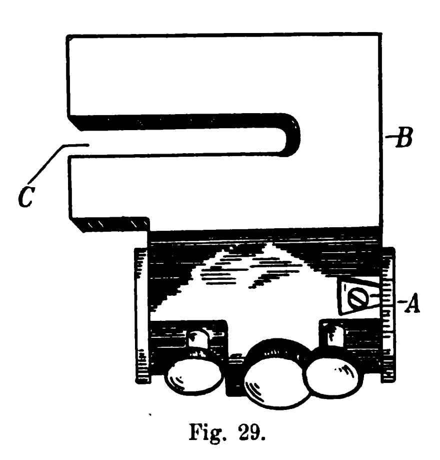


Fig. 29.

Richtungszeichen nach Born-Peter

Eine sehr exakt arbeitende Methode zur Anbringung von Richtungszeichen ist die von Born-Peter angegebene. Die Erfinder sagen über dieselbe folgendes: „Der Apparat, der zu unserem Verfahren nötig ist, ist derselbe, der jetzt allgemein zum Giessen der Paraffinblöcke gebraucht wird, zwei Neapeler Rähmchen und eine plan abgeschliffene Grundplatte, auf welcher diese aufgestellt und zusammengesetzt werden, um die mit flüssigem Paraffin zu füllende Kammer zu bilden.“ „Die Grundplatte besteht aus Glas oder Metall, sie ist kreisrund oder quadratisch, etwa 3 bis 4 mm dick, an der Oberfläche plan abgeschliffen und steht auf drei Füsschen oder zwei Leisten. Der Durchmesser beträgt 6 cm. In ihrer Mitte

[1]) Nach dem Ableben des Herrn Magen ist der Apparat durch die mechan. Werkstatt von F. Schmidt Berlin N. W. Thurm-Str. 46 zu beziehen.

ist ein Quadrat von 2 cm Seitenlänge mit schwarzen, eingeritzten Linien markiert. Ein mittleres Feld dieses Quadrates, das von einer Seite zur anderen reicht und 1 cm Breite hat, ist mit eingeritzten Linien versehen; natürlich können beliebige andere Abmaſse an Stelle der hier angeführten, die unseren Exemplaren entnommen sind und für die meisten Fälle praktisch erschienen, gewählt werden.

„Die eingeritzten Linien müssen streng folgende Vorschriften erfüllen: Sie stehen alle auf zwei Seiten des Quadrates senkrecht, sind also untereinander und den beiden anderen Seiten genau parallel. Ihre Zahl kann zwischen 15 und 20 liegen, so dass ihre wechselnden Abstände zwischen $^1/_2$ bis $^3/_4$ mm schwanken. Die Tiefe jeder Ritze beträgt ungefähr $^1/_{10}$ mm; sie soll in der Länge jeder Ritze gleichmäſsig, kann aber bei verschiedenen Ritzen verschieden sein. Jede Ritze soll von einem Ende bis zum anderen gleichmäſsig breit sein und ganz scharfe gradlinige Ränder besitzen; wieder aber braucht die Breite der verschiedenen Ritzen durchaus nicht gleichartig zu sein.“ „Die Einbettungsrahmen können ebenfalls aus Glas oder Metall gefertigt sein; bei dem Gebrauch einer metallenen Grundplatte sind solche aus Glas vorzuziehen. Bei unseren Exemplaren misst der kürzere Arm jedes Rahmens genau 2 cm, der längere etwas mehr (2,5—3 cm). Alle Winkel an dem Rahmen sollen rechte, alle Kanten gradlinig, alle Flächen eben sein; doch genügt eigentlich schon . . . . vollständig, wenn nur an einem der beiden Rahmen der Winkel, den die innere Seite des längeren Schenkels mit der Unterfläche bildet, streng ein rechter ist, und wenn die Kante dieses Winkels geradlinig und die innere Seite des längeren Schenkels eben ist. . . . . . . Die Höhe unserer Rahmen beträgt $1^1/_2$ cm.“ In Betreff der Einzelheiten bei der Einbettung mit diesem Apparat ist die Originalarbeit nachzusehen. Als wichtigste Punkte, auf die bei dem Einschluss in Paraffin zu achten ist, hebe ich folgende hervor:

1. Die Grundplatte und die Rinnen, sowie die Rahmen müssen ganz sauber sein. Man reibt sie mit absolutem Alkohol und dann mit Chloroform ab.
2. Beide werden mit einer Mischung von Glyzerin und absolutem Alkohol aa bestrichen, damit sich das erstarrte Paraffin leicht von ihnen ablösen kann.

3. Vor dem Eingiessen des Paraffins müssen Grundplatte und Rahmen angewärmt werden, damit das Paraffin sich gleichmäfsig ausbreiten kann.
4. Die Abkühlung wird in Eiswasser vorgenommen; hierbei ist ganz besonders darauf zu achten, dass das Paraffin zu einem gleichmäfsigen rechtwinkelig parallelepipedischen Block erstarrt. Bildet sich während des Erstarrens aut der Oberfläche des Paraffins eine Delle oder ein Trichter, so sind die Höhlungen derselben immer von neuem mit flüssigem Paraffin auszufüllen.
5. Nach vollständiger Erstarrung muss der Block gut vom Eiswasser bedeckt sein und in demselben möglichst lange stehen bleiben, bis Rahmen und Grundplatte von selbst abfallen. Man erhält so einen Block, dessen Unterseite die Richtungsebene ist; sie trägt als Richtungslinien die Abdrücke der Rinnen der Grundplatte.

Färbung der Richtungsebenen

Es kommt nun darauf an, die Richtungsebenen und Richtungsrinnen zu färben, damit sie sich auf dem Durchschnitt möglichst deutlich hervorheben. Die Farbmasse muss sich dabei mit Paraffin leicht durchtränken, sie muss in Xylol, Alkohol und Wasser unlöslich sein, um ein Nachfärben der Schnitte zu gestatten. Alle bisher angegebenen Verfahren sind aber mehr oder weniger unvollkommen. Man hat zur Färbung verwandt:

1. Die Farbpaste der blauen Faber'schen Schreibstifte für Glas; nachträgliches Firnissen mit dünner alkoholischer Schellacklösung (Strasser).
2. Lithographenschwarz; nachträgliches Firnissen mit dünner alkoholischer Schellacklösung (Strasser).
3. Lampenschwarz (Kastschenko). Dasselbe wird etwas mit Terpentinöl vermischt und in dünner Schicht aufgetragen.
4. Schwarzer Alkohollack nach Born-Peter; er stammt aus der Droguenhandlung von Hutstein in Breslau und ist eine Lösung von Nigrosin in alkoholischer, mit Dammar versetzter Schellacklösung. Er ist nur brauchbar, wenn keine Nachfärbung der Schnitte vorgenommen werden soll.

5. Mit Russ gefärbter Kollodiumüberzug nach Gaupp:
   a) „In einem Uhrschälchen setzt man zu einer geringen Menge von absolutem Alkohol einen bis zwei Tropfen Kollodium und rührt, nachdem man eine Messerspitze Russ zugefügt, mit dem Pinsel rasch durch; mit dieser Mischung wird die Definierebene schnell bestrichen“ (Born-Peter).
   b) „Man schüttet Russ in eine 1 proz. Celloidinlösung und bestäubt nach gehörigem Umschütteln mittels eines gewöhnlichen Zerstäubers die Fläche mit der schwarzen Flüssigkeit“ (Born-Peter). Wenn man hierbei nachfärben will, so setzt man zu dem absoluten Alkohol, den sie passieren müssen, nach Born-Peter Chloroform im Verhältnis von 8 : 1 zu, um die Lösung des Kollodiums zu vermeiden.
6. Kampferruss und Chloroform. Man zündet Kampfer an und lässt den Rauch gegen eine Porzellanscheibe gehen; mit einem mit Chloroform befeuchteten Pinsel nimmt man den so entstandenen Russ auf und bestreicht in dünner Schicht die Richtungsebene. Dann bleibt sie 24^{h} ruhig stehen, damit das Chloroform gehörig verdunsten kann.

Ist die Richtungsebene gefärbt, so umgibt man sie mit einer Schicht flüssigen Paraffins; dasselbe bildet nach dem Erstarren einen Überzug, der die Richtungsebene beim Schneiden schützt.

Graphische Rekonstruktion mit Hilfe von Richtungszeichen

Hat man nun an einem Objekt die Richtungsebene und sieht man auf den aufeinander folgenden Durchschnitten Objekt und Richtungszeichen, so verfährt man nach Kastschenko zum graphischen Aufbau in der Weise, dass man vermittelst einer Camera lucida oder des Projektionsapparates den ersten Durchschnitt mit seinem Richtungszeichen und den Konturen des Objektes zeichnet. Den zweiten Schnitt und alle folgenden stellt man nun so ein, dass die Richtungszeichen sich decken; die Konturen des Objektes sind jetzt andere; sie werden in die des vorhergehenden Schnittes eingezeichnet. Durch richtige Schattierung bekommt man dann einen plastischen Eindruck des Objektes; die Form derselben wird durch die graphische Isolierung genau wiedergegeben. Für die Fälle, wo die Durch-



schnitte des Objektes und die Richtungsebene nicht in ein und dasselbe Gesichtsfeld fallen, macht Kastschenko folgende Angaben: „Es gibt übrigens ein Mittel, auch solche Stellen der Schnitte zu rekonstruieren, bei deren Einstellung unter dem Mikroskop bei der betreffenden Vergrösserung keine Definierkonturen in das Gesichtsfeld gelangen können, obgleich man dabei etwas mehr Sorge tragen muss. Diese Art der graphischen Isolierung kann nur mittels eines solchen Mikroskopes ausgeführt werden, bei welchem die Drehbewegung des Tubus beseitigt ist (Bewegung mit Zahn und Trieb) und welches mit einem Revolver versehen ist. In diesem Falle schrauben wir an den letzten zwei Objektive an: das erste soll die für unseren Zweck genügende Vergrösserung geben; das zweite soll bedeutend schwächer sein. Dann stellen wir den ersten Schnitt bei dem stärkeren Objektive so ein, dass der uns interessierende Teil im Centrum des Gesichtsfeldes Platz nehme, zeichnen denselben und machen, wie das Präparat, so auch das Papier unbeweglich. Nachher wechseln wir das Objektiv und zeichnen die Definierkonturen hinein. Die letzteren sollen bei schwächerem Objektiv im Gesichtsfelde gesehen werden, sonst muss man statt dessen ein noch schwächeres Objektiv nehmen. Weiter stellen wir bei demselben schwächeren Objektiv den folgenden Schnitt auf solche Weise ein, dass seine Definierkonturen mit den eben gezeichneten zusammenfallen; dann wechseln wir das Objektiv wieder und zeichnen den uns interessierenden Teil bei stärkerer Vergrösserung hinein. Es bleibt nur noch übrig, auch für jeden folgenden Schnitt dasselbe zu tun, d. h. bei dem schwächeren Objektiv denselben einzustellen und bei dem stärkeren zu zeichnen, wobei natürlich, wie das Mikroskop mit Camera, so auch das Papier, auf welchem man rekonstruiert, absolut unbeweglich bleiben muss" (Kastschenko, Anatom. Anzeiger II, p. 433/434). Später hat Kastschenko noch ein einfacheres Mittel angegeben, um denselben Zweck zu erreichen. Er sagt: „Ich habe . . . . aus der Praxis gefunden, dass es für eine genaue Isolierung gar nicht notwendig ist, im Gesichtsfelde des Mikroskops zu gleicher Zeit die Definierkonturen und den der Isolierung unterliegenden Teil des Objektes zu haben; man braucht dazu gleichzeitig mit den Definierkonturen nur irgend einen Teil des Objektes zu sehen, welcher nach der Verschiebung des Präparates seinerseits gleichzeitig mit dem der Isolierung unterliegenden

Organ im Gesichtsfelde gesehen werden kann und der zur Definierung jenes Organes dienen muss. Dieser Teil gilt also als ein Verbindungsstück zwischen den Definierkonturen und dem Organ, welches man graphisch isolieren soll. Als solches Verbindungsstück gebrauche ich gewöhnlich irgend eine unebene und schief zu der Schnittfläche verlaufende Fläche, z. B. die äussere Oberfläche des Objektes" (Kastschenko, Anat. Anz. II, p. 581).

Verwendet man zum Zeichnen der mikroskopischen Schnitte einen Projektionsapparat, so umgeht man all diese Schwierigkeiten, da man hier wohl immer das Gesichtsfeld so gross machen kann, um Objekt und Richtungszeichen gemeinsam zu sehen. Daher empfiehlt denn auch Born dringend die Anwendung des Projektionsapparates. In allen Fällen aber ist es gut, die Richtungsebene so nahe wie nur irgend möglich an das zu rekonstruierende Objekt anzulegen.

Sind Richtungslinien vorhanden, so lässt sich auch diejenige Art der graphischen Rekonstruktion bequem anwenden, die auf der Messung des Abstandes beruht, den die successiven Durchschnitte des darzustellenden Objektes von den Richtungslinien haben. Man braucht dazu ein Okularmikrometer, bei dem der Wert der einzelnen Teilstriche für das angewandte Vergrösserungssystem bekannt ist. Zeichnungen der einzelnen Schnitte sind nicht nötig; auf den einander parallelen und in der notwendigen Entfernung von einander gezeichneten Linien des Papiers, die die Ebenen der einzelnen Schnitte darstellen, trägt man die den Durchschnittspunkten des Objektes entsprechenden Punkte auf, in einem Abstand von einer Grundlinie, der der mit dem Okularmikrometer gemessenen Entfernung der Organpunkte von der Richtungslinie im mikroskopischen Bilde entspricht. (Vergl. darüber: Woodworth, Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. XIV.) Eine graphische Methode zur Darstellung der Dickenverhältnisse von Wänden verschiedener Hohlräume und von Keimhäuten hat Weber (Anat. Bibliograph. XI) angegeben.

Graphische Rekonstruktion nach Tur

Tur endlich stellt die Wachstumserscheinungen verschieden alter Keimscheiben dadurch graphisch dar, dass er ihre einzelnen Oberflächenbilder in ein nnd dieselbe Zeichnung einzeichnet. Dabei werden die Keimscheiben immer so orientiert, dass im Bilde die vordersten Enden der Primitivrinne, d. h. die Hensen'schen Knoten, sich decken.

Durchsichtige Modelle

Nimmt man nun zur Anlegung der Zeichnungen nicht das gewöhnliche Zeichenpapier, sondern Pauspapier oder andere durchsichtige Substanzen und legt die Zeichnungen so über einander, dass die Richtungszeichen sich decken, so erhält man durchsichtige Modelle. Solche haben Strasser aus durchscheinenden Wachspapierplatten, Vosmaer aus Celluloidplatten, die mit Aceton verkittet wurden, noch andere aus Spiegelglasplatten hergestellt.

Plastische Rekonstruktion (Born)

Damit haben wir aber schon die graphische (zweidimensionale) Rekonstruktion verlassen und sind übergegangen zur **plastischen** oder dreidimensionalen. Statt der Celluloid- oder Spiegelglasplatten verwendet man nach dem Vorgange von Born-Strasser Wachsplatten von bestimmter Dicke. Auf sie klebt man die Zeichnungen der Schnitte und ihrer Richtungszeichen; die letzteren sind als Durchschnitte von Rinnen Zacken. Dann schneidet man die Hohlräume und die Oberfläche des Objekts, sowie die Richtungszacken aus, lässt aber zwischen Objekt und Zacken an einzelnen Stellen Brücken stehen. Nun werden die einzelnen Wachsplatten so übereinander gelegt, dass aus ihren Zacken wieder die ursprüngliche, nur vergrösserte, vertikal verlaufende Richtungsrinne gebildet wird. Dann verklebt man die Platten durch Bestreichen mit dem heissen Spatel miteinander, nimmt Brücken und Zacken fort, und das Wachsmodell ist fertig. Die Dicke der Wachsplatten steht nun in einer ganz bestimmten Beziehung zu der Schnittdicke einerseits und der angewandten Vergrösserung andererseits. Sie ist gleich dem Produkt aus Schnittdicke und Vergrösserung.

Instrumentarium zur plastischen Rekonstruktion

Das Instrumentarium zum Herstellen der Wachsplatten besteht nach Strasser aus

1. einem Lithographierstein,
2. verschieden dicken Metallstreifen, die $1^1/_2$—2 cm breit und so lang wie der Stein sind. Sie sind numeriert, je zwei von derselben Dicke tragen dieselbe Nummer. Die Dicke ist nach Born: 0,4, 0,6, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2 1,5, 1,8 und 2 mm,
3. einer eisernen Walze von 30 cm Länge und 4 cm Durchmesser, die über einem Gasflammengestell gleichmäfsig erwärmt werden kann.

Giessen der Platten

Giessen der Platten: Das Wachs wird zum Schmelzen gebracht; der Stein etwas erwärmt und mit Terpentin befeuchtet. Auf ihm liegen 2 gleich dicke Metallstreifen nebeneinander; ihr Zwischenraum muss kleiner sein als die Länge der Walze. Nun kommt auf den Stein die erste der Schnittzeichnungen, die alle auf gewöhnlichem ungeleimtem Papier angefertigt sind. Jetzt wird das Wachs in dem Raum zwischen die Metallstreifen über Zeichnung und Stein gleichmäfsig ausgegossen. Wenn es anfängt fest zu werden, streicht man mit der erwärmten Walze über die Metallstreifen gleichmäfsig hin und her unter mäfsigem Druck. So erhält

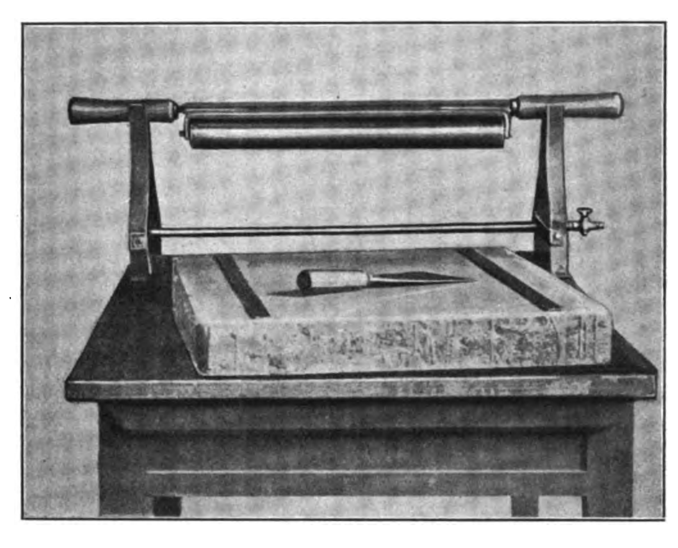


Fig. 30.

man eine Wachsplatte, die eben und nicht dicker ist, als die Dicke der verwandten Metallstreifen beträgt und die auf ihrer Unterfläche die Schnittzeichnung eingeschmolzen enthält. Mit einem breiten Spatel hebt man sie von dem Stein ab und fertigt eine zweite in gleicher Weise an, indem man die zweite Zeichnung einschmilzt u. s. f., bis alle Zeichnungen der Schnitte in Wachsplatten enthalten sind. Eine Zusammenstellung des eben beschriebenen Instrumentariums zur Anfertigung der Wachsplatten ergibt Abbildung 30 (Einrichtung des anat. biol. Institutes).

Plastische Rekonstruktion nach Schaper

Ohne Richtungszeichen kommt Schaper bei der Herstellung seiner Modelle aus, indem er die zum Aufbau des Modells nötigen Fixpunkte in den Embryo selbst verlegt. Er gibt als Bedingungen für seine Methode die folgenden an:

1. „Auswahl eines in möglichst gestreckter Lage fixierten Embryos zur Anfertigung der Serie.
2. Eine genaue Zeichnung oder Photographie der Umrisse des zu schneidenden Embryos in Seitenlage.
3. Festlegung der Schnittebene in der Zeichnung.
4. Anfertigung von Querschnitten oder Schrägschnitten, die senkrecht auf der Medianebene stehen."

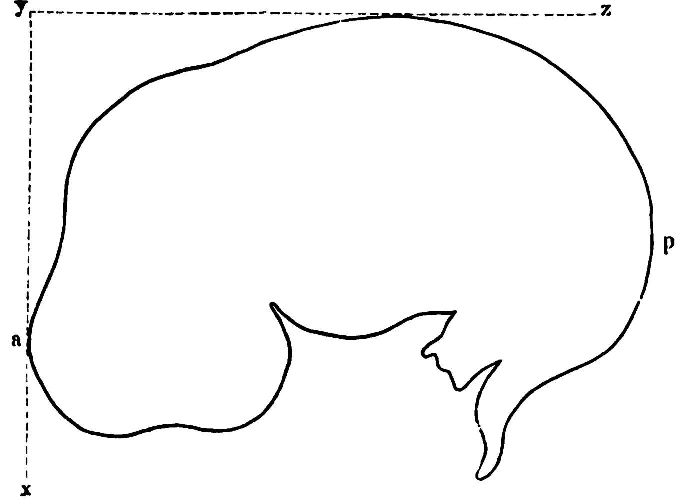


Fig. 31.

Die Zeichnung der Rückenlinie des Embryos, d. h. derjenigen Strecke der Rückenlinie, die zwischen zwei Punkten (a u. p) liegt, „an denen das Mikrotommesser den Embryo zuerst berührt und zuletzt verlässt", wird als Definierlinie gebraucht. (Vergl. hierzu die Fig. 31, welche die Zeichnung 1 der Schaper'schen Arbeit wiedergibt.) [1]

[1]) Auch die Figuren 32—34 sind Reproduktionen von Abbildungen der Arbeit von Schaper. Sie entsprechen den Originalfiguren 4, 7, 8.

In die Zeichnung des Embryo wird nun eine Gerade (y z) eingezeichnet, welche die Rückenlinie in einem Punkte berührt und eine dazu senkrechte Linie (x y), welche die Schnittrichtung darstellt. (Vergl. darüber Fig. 31 und Fig. 32).

„Sind somit alle Vorbedingungen für unsere Modelliermethode erfüllt, so können wir zum Einbetten des Embryos schreiten. Ich verwende hierzu stets metallene rechtwinkelige Einbettungsrahmen (Figur 32 E) und eine dünne Glasplatte als Unterlage. Unter die Glasplatte lege ich ein Stück Papier, auf welches ein rechter Winkel (Figur 32, x y z) gezeichnet ist, und bringe diesen in die Öffnung des Rähmchens zu liegen, derart, dass seine Schenkel parallel mit den Seiten des letzteren verlaufen. Nach diesen Vorbereitungen wird das Einbettungsrähmchen mit flüssigem Paraffin gefüllt, dann der

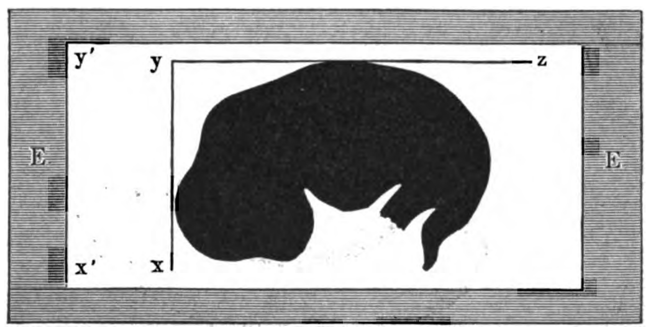


Fig. 32.

Embryo hineingebracht und schnell mit heissen Nadeln derart orientiert, dass seine bezügliche Lage (Figur 32) zu den Schenkeln des rechten Winkels auf dem unterliegenden Papier möglichst genau den Verhältnissen auf der Zeichnung Figur 31 entspricht und somit der eine Schenkel (in diesem Falle x y) die zukünftige Schnittrichtung darstellt. Da nun die Schenkel des rechten Winkels den Seiten des Einbettungsrähmchens parallel eingestellt waren, so repräsentiert die Seite x' y' (Fig. 32) des Paraffinblockes gleichzeitig die gesuchte Schnittfläche.“ Ist nun der Embryo in Schnitte zerlegt und sind die einzelnen Schnitte gezeichnet, so muss man innerhalb der Abbildungen derselben die beiden sog. Fixpunkte bestimmen. Sie kommen in die Medianlinie der Zeichnung (in die Medianebene des Schnittes) zu liegen. Man ziehe diese Median-

linie; sie durchschneidet paarig symmetrische Organe in der Mittellinie, das Rückenmark also z. B. in der Mitte der vorderen Kommissur. Dieser Punkt wird festgehalten und Medianpunkt (m) genannt; weiter schneidet die Medianlinie den Querdurchschnitt der Rückenlinie; dieser Schnittpunkt, der also innerhalb der Medianebene dorsalwärts vom Medianpunkt liegt, heisst Rückenpunkt (r). Beide, Medianpunkt und Rückenpunkt, werden auf jeder Wachsplatte mit

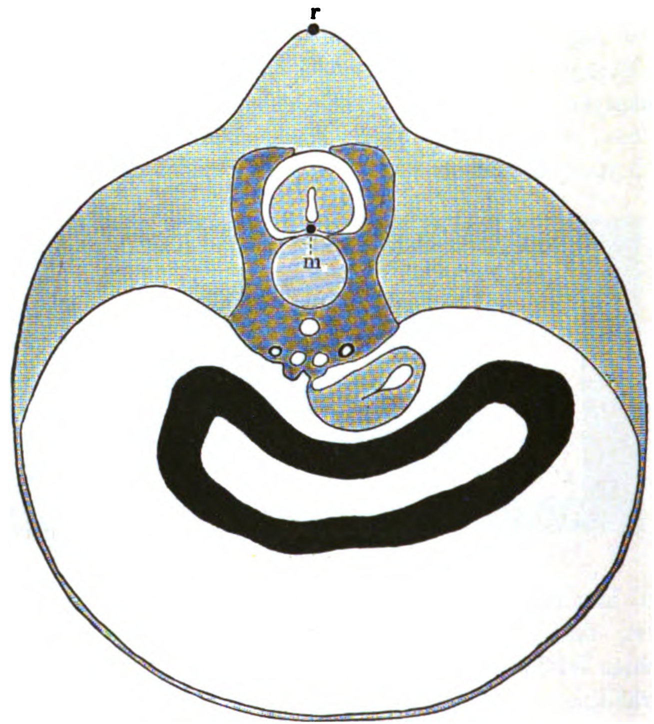


Fig. 33.

dem zu rekonstruierenden Organ in Verbindung gelassen. (Vergl. die Figg. 33 u. 34).[1]

Nun vergrössert man die Seitenzeichnung des Embryos auf die bei Herstellung der Schnittzeichnungen und Wachsplatten angewandte Vergrösserung, klebt sie auf Pappe und schneidet sie aus.

[1]) In diesem Beispiel handelt es sich um die Rekonstruktion des in den Figg. 33, 34 dunkel-schwarz gezeichneten Darmabschnittes.

So erhält man in der Pappe eine Öffnung, die die Umrisse des Embryos wiedergibt. Die Pappe wird nun senkrecht aufgestellt und in ihre Öffnung die einzelnen Wachsplatten nacheinander von der Seite hin eingeschoben, so dass sie mit der Ebene der Pappe einen rechten Winkel bilden. Beim Hineinschieben muss der Rückenpunkt immer den oberen Rand des Pappausschnittes berühren, die Medianpunkte müssen zusammenfallen und in die Ebene der Pappe zu liegen kommen.

Plastische Rekonstruktion nach Selenka

Als Material für die Platten ist zwar am geeignetsten Wachs, wie es Born und Strasser angegeben, es sind aber auch noch andere Materialien dazu verwandt worden, wie Leder, Zinkblech, Pappe. So stellt sich z. B. Selenka ein Pappmodell her, das aber die Eigentümlichkeit hat, dass gerade die soliden Teile des zu rekonstruierenden Organs ausgeschnitten sind, das Organ also durch den Hohlraum des Modells dargestellt wird. Diesen Hohlraum nun füllt er mit Wood'schem Metall (2 Teile Cadmium, 1 Teil Blei, 4 Teile Zinn), das bei 65° C. flüssig ist, beim Eingiessen aber auf 75° C. erhitzt wird. Durch Anbringen von Luftlöchern muss man dafür sorgen, dass die Luft beim Einfüllen aus den blind endenden Hohlräumen entweichen kann. Entfernt man nach Festwerden des Metalles die Pappe, so erhält man ein Metallmodell des untersuchten Organs. Natürlich kann man auf dieselbe Weise auch alle Hohlräume des embryonalen Körpers darstellen.

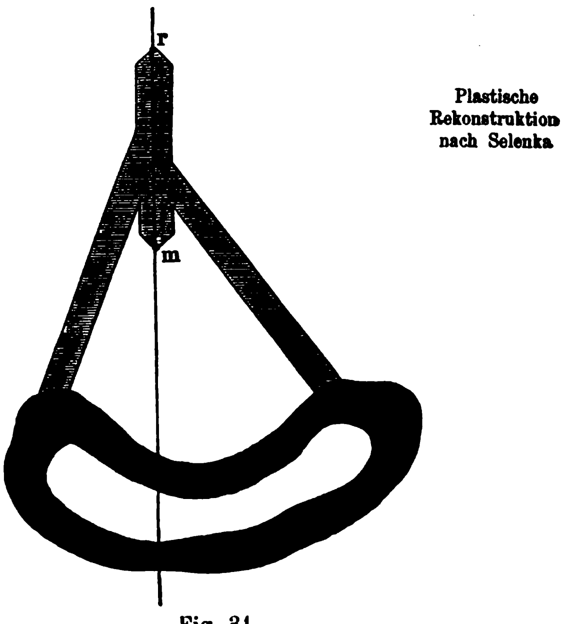


Fig. 34.

Die fertigen Wachsmodelle glättet man durch Überstreichen mit dem heissen Spatel oder durch schnelles Eintauchen in flüssiges Wachs, oder man bestreicht sie mit Farbe.

Literatur zu Kapitel 15.

Alexander, G., Zur Technik der Wachsplattenrekonstruktion: Über Richtungsebenen. Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. XIV, 1897. — Alexander, G., Zur „Herstellung von Richtungsebenen und Richtlinien von G. Born u. K. Peter". Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. XV, 1898. — Born, 1. Morpholog. Jahrb. 1876, Bd. II, p. 579; 2. Arch. mikr. Anatomie Bd. XXII, p. 584 u. f. — Born, G., Noch einmal die Plattenmodelliermethode. Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. V, 1888. — Born und Peter, Zur Herstellung von Richtebenen und Richtlinien. Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. XV, 1898. — Froriep, Aug., Zur Entwickelungsgeschichte d. Wirbelsäule, insbesondere des Atlas u. Epistropheus und der Occipitalregion. Arch. f. Anat. u. Physiol., anat. Abtlg., 1883, Leipzig — Hagen, Die Bildung des Knorpelskelettes beim menschlichen Embryo. Arch. f. Anat. u. Physiol., anat. Abtlg., 1900. — His, Wilhelm, Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbeltierleibes. 1. Die erste Anlage des Hühnchens im Ei. Leipzig, F. W. Vogel, 1868, p. 182. — His, Wilhelm, Anatomie menschlicher Embryonen, I. Leipzig, F. W. Vogel, 1880, p. 10—12. — His, Wilhelm, Über die Methoden der plastischen Rekonstruktion und über deren Bedeutung für Anatomie und Entwickelungsgeschichte. Anat. Anzeig. Bd. II, 1887 (I. Versammlg. d. anat. Gesellsch., Leipzig, 14.—15. April 1887.) — Kastschenko, Methode zur genaueren Rekonstruktion kleinerer makroskopischer Gegenstände. Arch. Anat. Physiol., anat. Abtlg., 1886. Leipzig — Kastschenko, N., Die graphische Isolierung. Anat. Anzeiger, Bd. 2. 1887, p. 426. Die graphische Isolierung bei mittleren Vergrösserungen. Anat. Anzeiger, Bd. 2, 1887, p. 579. — Kastschenko, Eine kurze Notiz in Bezug auf meine Methode. Zeitschr. wiss. Mikr. IV. — Kastschenko, Über das Beschneiden mikroskopischer Objekte. Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. V, 1888. — Krieger, Eine Methode, aus mikroskopischen Querschnitten eine Ansicht des untersuchten Gegenstandes zu konstruieren. Carius' Zoolog. Anzeiger Bd. I, 1878, Leipzig. Rosenberg, E., Über die Entwickelung der Wirbelsäule und des Centrale carpi des Menschen. Morpholog. Jahrb. I, 1876. Leipzig, p. 108/109. Anm. — Schaper, Zur Methodik der Plattenmodellierung. Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. XIII, 1897. — Selenka, Emil, Metallmodelle nach mikroskopischen Präparaten. Sitz.-Ber. d. physiol.-med. Societät Erlangen, Bd. XVIII, 1886, — Strasser, Über das Studium der Schnittserien und über die Hilfsmittel, welche die Rekonstruktion der zerlegten Form erleichtern. Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. III, 1886. — Strasser, Über die Methoden der plastischen Rekonstruktion. Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. IV, 1887. — Suzuki, Über eine neue Vorrichtung zum Schneiden der Richtebene. Anatom. Anzeiger Bd. XIV, 1898, p. 553. — Tur, Sur l'application d'une Méthode graphique aux recherches embryologiques. Bibliograph. anatomique Tome X, 1902. — Vosmaer, G., Eine einfache Modifikation zur Herstellung von Plattendiagrammen. Anat. Anzeiger Bd. XVI, 1899. — Weber, Une méthode de reconstruction graphique d'épaisseurs et quelques unes de ses applications à l'embryologie. Bibliographie anatomique Tome XI, 1902. — Wilson, A new system of obtaining directing-marks in microscopical sections for purposes of reconstructions by waxplate modelling. Zeitschr. wiss. Mikrosk. Bd. XVII. — Woodworth, On a method of graphic reconstruction from serial sections. Zeitschr. wiss. Mikr. Bd. XIV.

Sach- und Autoren-Register

N

O

S

T

U

Druck von Carl Ritter in Wiesbaden.

